

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof. Dr. rer. nat., Dr. med. K. Lang

Untersuchungen
an den Zellkernnucleosidtriphosphatasen
A und B,
ein Beitrag zu ihrer Individualität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Henning Zeidler
aus
Berlin (Charlottenburg)

Mainz 1967

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof.Dr.rer.nat.,Dr.med.K.Lang

Untersuchungen
an den Zellkernnucleosidtriphosphatasen A und B,
ein Beitrag zu ihrer Individualität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Henning Zeidler
aus
Berlin(Charlottenburg)

Mainz 1967

Dekan: Professor Dr.med.Lothar Diethelm
Referent: Professor Dr.med.Günther Siebert
Korreferent: Professor Dr.rer.nat.,Dr.med.Konrad Lang



Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1967

In dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
ATP-ase	=	Adenosintriphosphatase
CTP	=	Cytidin-5'-triphosphat
CTP-ase	=	Cytidintriphosphatase
dATP	=	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dATP-ase	=	Desoxyadenosintriphosphatase
dCTP	=	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dCTP-ase	=	Desoxycytidintriphosphatase
dGTP	=	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dGTP-ase	=	Desoxyguanosintriphosphatase
DNS	=	Desoxyribonucleinsäure
GTP	=	Guanosin-5'-triphosphat
GTP-ase	=	Guanosintriphosphatase
ITP	=	Inosin-5'-triphosphat
ITP-ase	=	Inosintriphosphatase
3'-Me-DAB	=	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol
NDP	=	Nucleosid-5'-diphosphat
NTP	=	Nucleosid-5'-triphosphat
NTP-ase	=	Nucleosidtriphosphatase
P	=	Orthophosphat
RNS	=	Ribonucleinsäure
TTP	=	Thymidin-5'-triphosphat
TTP-ase	=	Thymidintriphosphatase
UTP	=	Uridin-5'-triphosphat
UTP-ase	=	Uridintriphosphatase



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546219_0109

G L I E D E R U N G

Liste der Abkürzungen	3
E I N L E I T U N G	7
M E T H O D I K	9
1. <u>Behandlung der Versuchstiere</u>	9 - 11
a) Kontrolle I	9
b) Adrenalektomie	9
c) L-Thyroxin-Gabe	9
d) 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol-Gabe	10
e) Kontrolle II	10
f) Thioacetamid-Gabe	10
g) Proteinmangel-Ernährung	10
h) Wiederauffütterung nach Proteinmangel	11
2. <u>Zellkerngewinnung</u>	11 - 12
3. <u>Messung der Nucleosidtriphosphatasen-</u> <u>Aktivität</u>	13 - 18
a) Nucleosidtriphosphatase A	13
b) Nucleosidtriphosphatase B	15
c) Phosphatbestimmung	15
d) Berechnung der Enzymaktivitäten ...	16
e) Zahl der Messungen und statistische Auswertung	17
E R G E B N I S S E	19
1. <u>Hormonstatus und 3'-Methyl-4-dimethyl-</u> <u>aminoazobenzol-Gabe</u>	19 - 28
a) Enzymaktivitäten der Nucleosidtri- phosphatase A, Zeichentest und Aktivitätsänderung gegenüber der Kontrolle	19
b) Enzymaktivitäten der Nucleosidtri- phosphatase B, Zeichentest und Aktivitätsänderung gegenüber der Kontrolle	23
c) Substratspezifitätsänderungen der Nucleosidtriphosphatasen A und B ..	23
2. <u>Thioacetamidgabe und Fütterungsversuche</u>	29 - 36
a) Enzymaktivitäten der Nucleosidtri- phosphatasen A und B, Zeichentest und Aktivitätsänderung gegenüber der Kontrolle	29
b) Substratspezifitätsänderungen der Nucleosidtriphosphatasen A und B ..	29

3. <u>Zusammenstellung der Substrat-Spezifitäts- änderungen aller Versuchsgruppen nach der chemischen Konstitution der Substrate</u> ..	37 - 38
D I S K U S S I O N	39
I. Methodenkritik	39
A) Ausgangsmaterial:	39
1. <u>Behandlung der Versuchstiere</u>	39 - 41
2. <u>Zellkerngewinnung</u>	41 - 42
B) Eigene Untersuchungen:	42
1. <u>Enzymcharakter der Nucleosidtriphosphatasen und Reaktionsgleichung</u>	42
2. <u>Inkubations- und Phosphatbestimmungs- methode</u>	43 - 44
3. <u>Einheit der NTP-asen-Aktivität</u>	44
II. Diskussion der Ergebnisse	45
A) Substratspezifität und Substratspezifitäts- änderungen:	45
1. <u>Frühere Untersuchungen</u>	45
2. <u>Deutungsmöglichkeiten der Substrat- spezifitätsänderungen</u>	45 - 47
3. <u>Spezifische Nucleosidtriphosphatasen</u>	48 - 49
4. <u>ATP-asen und NTP-asen anderer Zellokalisation</u>	49
5. <u>Spezifische Nucleosidtriphosphatasen aus Bakterien</u>	50
B) Aktivitätsänderungen:	50
Z U S A M M E N F A S S U N G	52
L I T E R A T U R	53

EINLEITUNG

Die erste eingehende Untersuchung zweier Enzyme in Schweine-nierenzellkernen, die zunächst Adenosintriphosphatasen A und B (= ATP-asen A und B), später allgemeiner Nucleosidtriphosphatasen A und B (= NTP-asen A und B) genannt wurden, geht auf FISCHER, SIEBERT und ADLOFF [5] zurück. In dieser und weiteren Arbeiten wurden mit ungereinigtem Zellkernmaterial pH -Optimum, Kationeneffekte, K_m -Werte und Löslichkeit der beiden Enzyme festgestellt [5, 25], ihre intranucleäre Lokalisation gesichert [5, 31] und für Schweine- und Rattenleber erste Daten der Spezifität dieser Enzyme gegenüber Pyrimidin- und Purinbasen aus der Ribosid-5'-triphosphat- und Desoxyribosid-5'-triphosphat-Reihe gewonnen [5, 25, 27]. Schwierigkeiten machte der Versuch, die beiden Enzyme in angereicherter oder reiner Form aus Zellkernpulver zu isolieren [29].

Aktivitätsmessungen der NTP-asen mit Zellkernen regenerierender Rattenlebern [29] ließen zum ersten Mal Zweifel an der Individualität der beiden NTP-asen auftauchen und vermuten, daß die beobachteten NTP-Spaltungen von mehreren Nucleosidtriphosphatasen mit ausgeprägter Substratspezifität verursacht sein könnten. Die Vermutung wurde verstärkt durch die bisher noch schwer reproduzierbare präparative Abtrennung einer Fraktion, die GTP-ase A-Aktivität besitzt und einer Fraktion, die ATP-ase A-Aktivität enthält mit zuungunsten von UTP verschobener Substratspezifität [29].

Es boten sich beim gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse von den Zellkern-NTP-asen verschiedene Möglichkeiten, das Problem der Individualität dieser Enzyme einer experimentellen Lösung zuzuführen:

1. Die präparative Methode der Isolierung angereicherter oder reiner Enzymfraktionen mit definierter Substratspezifität.
2. Die analytische Methode der Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen, unter denen die NTP-asen A und B die einzelnen NTP spalten, ihrer Hitzeresistenz und andere mehr. Solche Untersuchungen lagen bisher nur für ATP als Substrat vor [5].
3. Die tierexperimentelle Methode der Enzymaktivitätsmessung und spezifitätsmessung mit Zellkernmaterial, das von Tieren gewonnen wurde, die bestimmten biologischen Zuständen ausgesetzt waren, um eine Veränderung im Zellkernstoffwechsel hervorzurufen.

Im Rahmen der Arbeiten von Herrn Prof. G. SIEBERT fiel dem Untersucher die Aufgabe zu, auf dem letztgenannten Wege einen Beitrag zur Beantwortung der Frage nach der Individualität der NTP-asen zu leisten.

Es wurden 6 verschiedene Zellkernpräparationen aus Rattenlebern zur Verfügung gestellt. Die Tiere waren unter den folgenden biologisch-pathologischen Gesichtspunkten vorbe-handelt worden:

1. Hormonale Beeinflussung des Zellkernstoffwechsels durch L-Thyroxingabe und durch Adrenalektomie.
2. Veränderung des Zellkernstoffwechsels im Stadium der Krebsentstehung nach Gabe von 3'-Methyl-4-dimethylamino-azobenzol (= Buttergelb) und von Thioacetamid.
3. Nutritive Modifikation des Zellkernstoffwechsels durch Proteinmangelernährung und durch Wiederauffütterung nach Proteinmangelernährung.

Die Enzymaktivität der NTP-asen A und B sollte mit Ribonucleosid-5'-triphosphaten und Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten als Substraten durch Messung des aus den Nucleosid-5'-triphosphaten freigesetzten Orthophosphats bestimmt werden. Die Substratspezifitäten jeder Versuchsgruppe sollten berechnet und unter dem Gesichtspunkt ausgewertet werden, ob es Anzeichen dafür gibt, daß die NTP-asen-Aktivität in Rattenleberzellkernen durch Nucleosidtriphosphatasen mit ausgeprägter Substratspezifität bedingt sein kann.

M E T H O D I K

Zunächst soll die Behandlung der Versuchstiere und die Gewinnung der Zellkerne aus den Rattenlebern dargestellt werden, die nicht vom Untersucher selbst durchgeführt wurden. Im Anschluß daran wird die Anordnung und Durchführung der eigenen Versuche beschrieben.

1. BEHANDLUNG DER VERSUCHSTIERE

Die der Zellkerngewinnung vorausgegangenen Experimente an den Ratten führte an 4 Versuchsgruppen - Kontrolle, Adrenalektomie, L-Thyroxingabe und 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol-Gabe (=Buttergelb=3'-Me-DAB) - Dr. REID im Chester Beatty Research Institute des Royal Cancer Hospital London durch. Im Physiologisch-chemischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz wurde eine zweite Versuchsreihe bearbeitet, die ebenfalls aus 4 Versuchsgruppen bestand: einer Kontrollgruppe, einer mit Thioazetamid gefütterten Gruppe, einer Gruppe, die einem Proteinmangel ausgesetzt wurde, und einer, bei der eine Wiederauffütterung nach Proteinmangel erfolgte.

Nach den Angaben von Dr. REID wurden die von ihm benutzten Versuchstiere folgendermaßen vorbehandelt:

a) Kontrolle I:

20 männliche Ratten vom Albino-Stamm Chester Beatty bekamen 16 Tage lang eine Normalkost ad.lib., die 20% Protein enthielt. Die Tiere wurden für eine Nacht vom Futter abgesetzt, am folgenden Tag getötet und ihre Leber in der unten beschriebenen Form gewonnen.

b) Adrenalektomie:

Für diese Versuchsgruppe wurde die gleiche Zahl männlicher Ratten vom gleichen Stamm wie bei der Kontrollgruppe benutzt. Die Tiere bekamen 16 Tage lang das oben angegebene Futter und wurden 3 Tage vor Versuchsende adrenalektomiert. Vom Zeitpunkt der Operation an wurde ihrem Trinkwasser 0,9% NaCl zugesetzt.

c) L-Thyroxingabe:

Die Tiere dieser Versuchsgruppe, die im übrigen wie die Kontrolle behandelt wurden, bekamen an den beiden letzten Tagen pro Ratte eine Injektion von 0,1 mg L-Thyroxin.

d) 3'-Me-DAB-Gabe:

In diesem Falle wurden die Ratten 15 Tage lang mit einer riboflavinarmen Standard-Diät gefüttert, die 0,075% 3'-Methyl-5-dimethylaminocarbonyl-aminocarbonyl enthält, und bekamen dann einen Tag lang die den Kontrolltieren verabreichte Normalkost. Im übrigen wurden die Bedingungen der Kontrolle eingehalten.

Bei allen 4 Versuchsgruppen wurde den Ratten nach der Friar-Stop-Technik von BUCHER und Mitarbeitern [11] die Leber entnommen. Das so gewonnene und eingefrorene Material gelangte auf dem Luftwege von London nach Mainz. Im Labor von Prof. C. SIEBERT wurde die Isolierung der Zellkerne durchgeführt.

Die zweite, in Mainz durchgeführte Versuchsreihe wurde folgendermaßen angesetzt:

e) Kontrolle II:

Als Versuchstiere wurden 40 Ratten, 20 männliche und 20 weibliche Tiere, vom Sprague-Dawley-Stamm (W. Gassner, München) mit einem Gewicht von 130-190 g ausgewählt. Sie bekamen ad lib. 15 Tage lang Altromin (Altromin GmbH, Lage/Lippe), das 19% Protein enthielt, und wurden vor der Tötung für eine Nacht vom Futter abgesetzt.

f) Thioacetamid-Gabe:

Eine gleiche Zahl von Tieren wie in der Kontrollgruppe und aus dem gleichen Stamm wurde 5 Tage mit Altromin gefüttert. Anschließend bekamen die Ratten 13 Tage ad lib. ein 0,55% Thioacetamid (Firma Merk, Darmstadt) enthaltendes Futter, das durch Lösung von 330mg Thioacetamid in 20ml Äthanol und Vermischung mit 1 kg Altromin hergestellt wurde [12]. Im übrigen erfuhren die Tiere die gleiche Behandlung wie die Kontrollgruppe.

g) Proteinmangel-Ernährung:

Es handelte sich bei dieser Versuchsgruppe wieder um das gleiche Tiermaterial wie oben in der Kontrollgruppe angegeben. Die Ratten wurden 9 Tage lang mit einer Proteinmangelkost ad lib. gefüttert, für eine Nacht vom Futter abgesetzt und anschließend getötet. Die Proteinmangelkost wurde aus Altromin durch Verdünnung des Proteingehaltes mit Mondamin auf 7,5% und Zusatz von 9,5g Vitamin-B-Komplex/kg-Futter hergestellt (Vitamin-B-Komplex von Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach/Baden).

h) Wiederauffütterung und Proteinmangel

Die Tiere bekamen wie die vorherige Gruppe 8 Tage lang die Proteinmangelkost ad.lib. und anschließend 3 Tage lang zur Wiederauffütterung die angegebene Altromin-Kost. Im übrigen wurden alle bei der Kontrollgruppe benützten Bedingungen eingehalten.

Wie bei der ersten in London durchgeführten Versuchsreihe wurden auch bei diesen 4 Versuchsgruppen die Rattenlebern nach der Frier-Stop-Technik von BÜCHER und Mitarbeitern [11] gewonnen.

2. ZELLKERNGEWINNUNG

Als Ausgangsmaterial für die Zellkernherstellung dienten die im gefrorenen Zustand vorliegenden Rattenlebern. Sie wurden durch Lyophilisierung getrocknet, zur Zerstörung der Zellen gemahlen und durch Zentrifugieren in Gemischen organischer Lösungsmittel in der von SIEBERT beschriebenen Modifikation [28] des von BEHRENS angegebenen Prinzips zu Zellkernfraktionen aufgearbeitet.

In Form des Trockenpulvers wurden die Zellkerne bis zu ihrer Verwendung in der Tiefkühltruhe bei -23°C und in Gegenwart eines Trockenmittels (Silicagel) aufbewahrt.

Als Reinheitskriterium für die Zellkernpräparationen erschien die Bestimmung von RNS-Gehalt, DNS-Gehalt und RNS/DNS-Quotienten der Zellkernpräparationen und des nicht fraktionierten Gewebes ausreichend, da die intranucleäre Lokalisation der Nucleosidtriphosphatasen hinlänglich gesichert werden konnte [5, 30, 31].

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Bestimmungen zusammengestellt. Die Trennung der DNS und RNS nach SCHNEIDER und die Bestimmung der DNS nach DISCHE wurden wie bei SCHNEIDER [24] angegeben, die RNS-Bestimmung mit der Methode nach LUSENA - wie bei HINSBERG und LANG [10] angegeben - durchgeführt.

TABELLE 1: RNS-Gehalt, DNS-Gehalt und RNS/DNS-Quotient des nichtfraktionierten Gewebes und der untersuchten Zellkernfraktionen aus Rattenlebern

		RNS-Gehalt % Trocken- gewicht	DNS-Gehalt % Trocken- gewicht	RNS/DNS- Quotient
(a)	Kontrolle I	(c) 10,0	2,2	4,55
		(d) 4,3	16,3	0,264
	Adrenalektomie	(c) 8,5	1,6	5,32
		(d) 7,7	8,3	0,928
	L-Thyroxingabe	(c) 7,3	2,8	2,61
		(d) 6,3	14,3	0,441
	3'-Me-DAB-Gabe	(c) 7,7	1,1	7,0
		(d) 7,2	10,7	0,672
(b)	Kontrolle II	(c) 3,39	1,88	1,79
		(d) 3,57	15,7	0,227
	Thio- acetamidgabe	(c) 3,2	1,76	1,82
		(d) 3,62	13,9	0,260
	Proteinmangel	(c) 4,16	1,82	2,28
		(d) 3,24	20,3	0,160
	Wieder- auffütterung nach Proteinmangel	(c) 3,43	1,62	2,12
		(d) 2,91	18,9	0,154

- (a) Versuchsreihe I
 (b) Versuchsreihe II
 (c) nichtfraktioniertes Gewebe
 (d) isolierte Zellkerne

3. MESSUNG DER NTP-ASEN-AKTIVITÄT

Die eigenen Untersuchungen wurden von dem als Trockenpulver vorliegenden Zellkernmaterial ausgehend an Zellkernsuspensionen durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den von FISCHER, SIEBERT und ADLOFF [5] angegebenen optimalen Reaktionsbedingungen der Nucleosidtriphosphatasen in Schweinenieren-Zellkernen und den von SIEBERT und BAUER [34] ausgearbeiteten Ansätzen zur Bestimmung ihrer Aktivität in Rattenleber-Zellkernen wurde die Aktivität der Nucleosidtriphosphatasen A und B wie folgt gemessen:

a) Nucleosidtriphosphatase A:

Die Herstellung des Inkubationsgemisches erfolgte in einem 1,5ml-Zentrifugenglas in der aufgeführten Menge und Reihenfolge:

0,025ml	-----	3 x 10 ⁻³ m Mg ⁺⁺
0,025ml	-----	2,6 x 10 ⁻² m KCL
0,050ml	-----	5 x 10 ⁻² m Tris-Maleat-Puffer (pH 5,9)
0,050ml	-----	H ₂ O bidest.
0,025ml	-----	5 x 10 ⁻³ m Substratlösung
0,025ml	-----	Zellkernsuspension
0,200ml	-----	Inkubationsvolumen

Alle Konzentrationsangaben stellen Endkonzentrationen dar.

Als Substrate fanden Verwendung: die Ribonucleosidtriphosphate Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Guanosin-5'-triphosphat (GTP), Inosin-5'-triphosphat (ITP), Cytidin-5'-triphosphat (CTP), Uridin-5'-triphosphat (UTP) und die Desoxyribonucleosidtriphosphate Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP), Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP), Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP) und Thymidin-5'-triphosphat (TTP). Mit Ausnahme von ITP, das von der Firma Sigma (St.Louis) bezogen wurde, stammten alle Substrate von der Firma Pabst (Milwaukee). Sie wurden in einem Gemisch gleicher Teile H₂O bidest. und Tris-Maleat-Puffer, pH 5,9, gelöst und jeweils für die Dauer der Untersuchungen an der 1. bzw. 2. Versuchsreihe (etwa 4 Wochen) angesetzt. Zur Aufbewahrung standen sie in gefrorenem Zustand in der Tiefkühltruhe. Kurz vor Beginn eines jeden Versuches wurden sie aufgetaut und während der Verwendungszeit unter Eiskühlung gehalten.

Das Inkubationsgemisch wurde vor Zusatz der Substratlösungen im Wasserbad auf 37°C erwärmt, das entsprechende

Substrat zugesetzt und anschließend die Reaktion gestartet durch Zugabe der Zellkernsuspension, die auf einen Glaslöffel pipettiert und mit diesem direkt in das Inkubationsgemisch gebracht wurde, um Verluste durch Haftbleiben an der Glaswand zu vermeiden.

Die Herstellung der Zellkernsuspension erfolgte mindestens eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn aus dem jeweiligen Zellkerntrockenpulver und einer 0,014 M KCL-Lösung durch gründliches Zerreiben von Hand im Glashomogenisator unter Eiskühlung. Auch nach Fertigstellung der Suspension wurde die Eiskühlung beibehalten, um Spontanreaktionen in der Zellkernsuspension vor Zugabe in das Inkubationsgemisch auf ein Minimum herabzusetzen. Je nach der Menge des verfügbaren Zellkerntrockenpulvers wurde die Verdünnung der Suspension im Bereich von 1:40 - 1:100 gewählt. Nach den Erfahrungen von SIEBERT und BAUER [34] ist bei diesen Verdünnungen und den hier angegebenen Versuchsbedingungen die lineare Proportionalität der enzymatischen Reaktion zur Zeit und zur Enzymmenge gewahrt, wenn ATP als Substrat verwendet wird. Es wurde jeweils soviel an Zellkernsuspension hergestellt, daß die Untersuchungen an allen 9 Substraten mit der gleichen Suspension durchgeführt werden konnten.

Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Die Gläser wurden eine Minute vorher aus dem Wasserbad entnommen, in Eis gestellt und die Reaktion nach Ablauf der Versuchszeit durch Entleerung mit 0,8 ml einer eisgekühlten 3,125%igen HClO_4 -Lösung gestoppt, entsprechend der von FISCHER, SIEBERT und ADLOFF [5] angegebenen Endkonzentration von 2,5% HClO_4 .

In den Nullwerten der Enzymquelle wurde bei sonst gleicher Behandlung die HClO_4 -Lösung vor den Zellkernen zugegeben, die Gläser nach dem Einpipettieren der Enzymlösung dem Wasserbad entnommen und in Eis gestellt. So wurde durch das sofortige Ausfällen des Enzymproteins eine Reaktion zwischen Enzym und Substrat praktisch unterbunden.

Als Leerwerte der Enzymquelle wurden die gleichen Ansätze wie oben verwendet und die Enzymquelle durch Aqua bidest. ersetzt. Analog zu den Versuchen mit Zellkernsuspensionen betrug die Inkubationsdauer 30 Minuten bei anschließender Zugabe der eisgekühlten HClO_4 -Lösung und 0 Minuten bei sofortiger Zugabe. Die Leerwerte der Enzymquelle dienten allein zur Kontrolle der Substratlösungen und einer eventuellen nicht enzymatischen Substrathydrolyse, wofür sich aber keine Hinweise fanden. Im Gegenteil zeigte sich für alle Substrate ein geringer Phosphatschwund, der einen Wert von 0,3 μMol Orthophosphat/h/ml Inkubationsgemisch in keinem Fall überschritt und nicht mehr als das 0,04-fache

der Phosphatfreisetzung durch die NTP-asen A und B der Kontrollgruppe I betrug. Dieser Phosphatschwund fand für die Berechnung der Enzymaktivitäten keine Berücksichtigung.

b) Nucleosidtriphosphatase B:

Als optimale Reaktionsbedingungen für dieses Enzym in Rattenlebertalkernen wurden von SIEBERT und BAUER [34] folgende Ansätze ausgearbeitet:

0,025ml	-----	5 x 10 ⁻³ m Ca ⁺⁺
0,025ml	-----	1 x 10 ⁻⁴ m Versen
0,050ml	-----	5 x 10 ⁻² m Tris-HCl-Puffer, pH 8,4
0,050ml	-----	H ₂ O bidest.
0,025ml	-----	5 x 10 ⁻³ m Substratlösung
0,025ml	-----	Zellkernsuspension
0,200ml	-----	Inkubationsvolumen

Die Substrate waren in einem Gemisch zu gleichen Teilen H₂O bidest. und Tris-HCl-Puffer, pH 8,4, gelöst und die Zellkerne in H₂O bidest. suspendiert. Sonst entsprachen alle Versuchsbedingungen den bei der Nucleosidtriphosphatase A gemachten Angaben.

c) Phosphatbestimmung:

Um die Nucleosidtriphosphatasen-Aktivität mit Hilfe einer colorimetrischen Messung des Orthophosphats zu bestimmen, fand die Phosphatbestimmungsmethode von MARTIN und DOWY in der von WEIL-MALHERBE beschriebenen Form Anwendung [40]. Die mit HClO₄ enteiweißten und in Eis stehenden Ansätze wurden wie von SIEBERT und BAUER [34] angegeben 3 Minuten scharf zentrifugiert - Zentrifuge von der Firma Runne Nachf., Heidelberg-Rohrbach -, von dem eiweißfreien Überstand 0,5ml entnommen und sofort der Phosphatbestimmung zugeführt. Im Anschluß an die einzelnen Reaktionsschritte - Bildung des Phosphormolybdänsäurekomplexes, Extraktion aus der wässrigen Phase in die organische Phase eines Isobutanol-Benzolgemisches und Reduktion eines aliquoten Teiles mit SnCl₂-Lösung zu Phosphormolybdänblau - wurden die Extinktionen am Zeiss-Spektralphotometer M4 Q III (Carl Zeiss, Oberkochen/Württemberg) bei einer Wellenlänge von 740mμ gemessen.

Bei jeder Bestimmungsreihe lief ein Leerwert mit den Reagenzien der Phosphatbestimmung mit und zur Kontrolle der Eichkurve zwei Standardwerte, die 2γ bzw. 4γ PO₄³⁻ einer Standardlösung enthielten.

Alle für die Inkubation und Phosphatbestimmung benutzten Chemikalien stammen von der Firma Merk, Darmstadt.

d) Berechnung der Enzymaktivitäten:

Den Berechnungen der Enzymaktivitäten wurde eine Extinktion von 0,057 pro 1γ PO_4^{3-} im Ansatz der Phosphatbestimmung zugrunde gelegt. Dieser Wert wurde in einem Versuch ermittelt durch Aufstellung einer Eichkurve über die Abhängigkeit der gemessenen Extinktionen von den vorgelegten PO_4^{3-} -Mengen und durch Berechnung des Mittelwertes. Die Meßergebnisse stimmten mit den Erfahrungen des hiesigen Labors überein. Folgende Werte fanden sich bei der Bestimmung der Eichkurve (Tabelle 2):

TABELLE 2: Eichkurve der Phosphatbestimmung

vorgelegtes PO_4^{3-} in γ	gemessene Extinktionen	errechnete Extinktion/ 1γ PO_4^{3-}
0,5	0,028	0,056
1	0,055	0,055
1,5	0,083	0,055
2	0,111	0,056
2,5	0,145	0,058
3	0,174	0,058
3,5	0,198	0,057
4	0,231	0,058
4,5	0,258	0,057
5	0,282	0,056

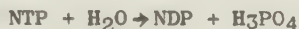
Für das Inkubationsgemisch, das nur zur Hälfte dem Ansatz der Phosphatbestimmung zugeführt wurde, galt demnach, daß bei einer Extinktion von 0,057 sein PO_4^{3-} -Gehalt 2γ betrug.

Die eigentliche Berechnung der Aktivität der NTP- α -asen erfolgte in zwei Schritten folgendermaßen:

- (1) Aus den Extinktionen der 30-Minuten- und 0-Minuten-Ansätze der Enzymquelle wurde die Differenz gebildet, die als Maß für die während der Inkubationsdauer durch die NTP- α -asen freigesetzte Phosphatmenge gelten konnte.
- (2) Aus diesem Wert errechnete sich die Enzymaktivität durch Multiplikation mit einem bestimmten Faktor, der je nach der vorgelegten Enzymkonzentration und dem DNS-Gehalt der Zellkerne variierte. In diesen Faktor gingen als einzelne Komponenten ein: die Umrechnung der Extinktionsdifferenz auf die Phosphatmenge im Inkubationsgemisch (Extinktion $0,001 \pm 0,0351\gamma$ PO_4^{3-} im Inkubationsgemisch) und die Umwandlung der in Gamma

ermittelten Phosphatmenge in Mikromole ($31 \gamma \text{ PO}_4^{3-} = 1 \mu\text{Mol PO}_4^{3-}$), ferner die Umrechnung von 30 Minuten auf eine Minute Reaktionsdauer der Enzymwirkung, von der in 0,025ml Inkubationsgemisch enthaltenen Enzymmenge auf die in 1g Zellkernpulver vorhandene und schließlich die Angabe der Enzymaktivität pro Gramm DNS der Zellkerne entsprechend der oben angegebenen Analyse des Zellkernpulvers auf seinen DNS-Gehalt (s. Tab.1).

Entsprechend der angenommenen Reaktionsgleichung der NTP-asen-Wirkung [29]



wird pro Mol gespaltenes NTP ein Mol Phosphorsäure freigesetzt, so daß die zunächst von der entstandenen Phosphorsäure ausgegangene Berechnung der Enzymaktivität auf die Menge des gespaltenen NTP übertragen werden könnte. Der Untersucher entschloß sich nicht dazu, da Phosphat freisetzende Nebenreaktionen zwar unwahrscheinlich gemacht, aber nicht ganz ausgeschlossen werden konnten [29]. Die in dieser Arbeit angegebenen NTP-asen-Aktivitäten besitzen demnach die folgende Dimension: μMol freigesetztes Ortho-Phosphat (= P) pro eine Minute Reaktionszeit und pro ein Gramm DNS der Zellkernfraktion ($\mu\text{MolP/min/g DNS}$).

Als Beispiel einer Berechnung sei die Aktivität der NTP-ase A aus der Zellkernfraktion der „Kontrolle I“ gegenüber dem Substrat ATP angegeben:

TABELLE 3: Berechnung der NTP-asen-Aktivität

Extinktion		Differenz der Extinktionen	Enzymaktivität ($\mu\text{Mol P/min/g DNS}$)
0'-Wert	30'-Wert		
0,064	0,0186	0,122	45,0

Alle Berechnungen wurden mit Rechenschiebergenauigkeit durchgeführt.

e) Zahl der Messungen und statistische Auswertung:

Die beschränkte Menge an Zellkern-trockenpulver erlaubt nur zwei Messungen der Enzymaktivität einer Zellkernfraktion für jedes der Substrate durchzuführen. Für beide Messungen wurde als Enzymmaterial die gleiche Zellkern-

fraktion verwendet, die benötigten Mengen an Zellkernpulver aber getrennt voneinander und zu verschiedenen Zeiten eingewogen und wie beschrieben zur Zellkernsuspension homogenisiert.

Ergab sich zwischen den Werten der 1. und 2. Messung eine Differenz von $>0,25$ -fach des kleineren Wertes, so wurde nach Möglichkeit eine 3. Messung angeschlossen, für die wie bei den ersten eine neue Zellkernsuspension verwendet wurde. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde aus den zwei oder gegebenenfalls drei Meßwerten der Mittelwert gebildet.

Wie oben bereits angegeben, wurde jede Zellkernpräparation aus den Lebern von nicht weniger als 20 Ratten und zum Teil 40 Ratten gewonnen. Insofern war der durch die Zahl der Individuen bedingten biologischen Variationsbreite weitgehend Rechnung getragen worden, und jede Zellkernpräparation konnte als repräsentativ für ein Kollektiv gelten.

Für eine statistische Bearbeitung der Ergebnisse bot sich der Zeichentest an in Anbetracht der geringen Zahl der Messungen und der Tatsache, daß das Untersuchungsmaterial für jede Versuchsgruppe einer einzigen Zellkernpräparation entstammte. Durch den zweiseitigen Zeichentest läßt sich ein Gleichbleiben oder Abweichen der Enzymaktivitäten der Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe statistisch wahrscheinlich machen. Bei einem Vergleich der Mittelwerte der Enzymaktivitäten aller neun Substrate in der Kontrolle und der Versuchsgruppe ergaben sich somit eine Zahl von neun Stichprobendifferenzen ($n = 9$) und folgende Schranken der Irrtumswahrscheinlichkeit, die in Tabelle 4 zusammengestellt sind [39].

TABELLE 4: Schranken bei zweiseitigem Zeichentest

n = 9	2	7	1	8	1	8	
n = 8	1	7	1	7	1	7(a)	
	5%		2%		1%		Irrtums- wahrscheinlichkeit
(a) Außerhalb der Schranken der Effekt gesichert							

Liegt in 8 von 9 Fällen eine gleichsinnige Abweichung vor, so besteht 1% Irrtumswahrscheinlichkeit, und eine Aussage im Sinne dieser Abweichung kann als „stark gesichert“ (signifikant) gelten; bei 7 Fällen von 9 liegt 5% Irrtumswahrscheinlichkeit und damit eine „schwach gesicherte“ (auffällige) Aussage vor [38].

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden in zwei getrennten Abschnitten dargestellt, da den ermittelten Aktivitäts- und Spezifitätsänderungen in Versuchsreihe I und II unterschiedliche Kontrollgruppen als Bezugsgröße zugrunde liegen. Eine Zusammenstellung nach biologisch-pathologischen Kriterien kann deshalb nur teilweise durchgeführt werden.

1. HORMONSTATUS UND 3'-Me-DAB-GABE

- a) Enzymaktivitäten der NTP-ase A, Zeichentest und Aktivitätsänderung gegenüber der Kontrolle:

In Tabelle 5 sind die Enzymaktivitäten der Nucleosidtriphosphatase A aus Versuchsreihe I zusammengefaßt, die aus 4 Versuchsgruppen besteht; einer Kontrollgruppe (1), einer Gruppe adrenaletomierter Tiere (2), einer Gruppe von Ratten mit L-Thyroxininjektion (3) und einer, die 3'-Me-DAB verfüttert bekam (4). Für jede Versuchsgruppe sind die Werte der ersten und zweiten, gegebenenfalls dritten Messung wiedergegeben und die aus diesen berechneten Mittelwerte.

Ebenfalls in der Tabelle enthalten ist eine Auswertung der Ergebnisse nach dem Zeichentest. Es zeigt sich bei Gruppe 2 und 4 für alle Substrate eine Aktivitätssteigerung, die entsprechend den Ausführungen über den Zeichentest im methodischen Teil mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% „stark gesichert“ ist. In Gruppe 3 kann kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden.

Um neben der mit dem Zeichentest faßbaren Aussage über eine eingetretene Veränderung der Enzymaktivität auch ein Bild von der quantitativen Änderung der NTP-ase-Aktivität zu gewinnen, wurde für jedes Substrat der Quotient aus dem Mittelwert der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe gebildet:

$$\frac{\text{NTP (Versuch)}}{\text{NTP (Kontrolle)}}$$

TABELLE 5: Aktivität ($\mu\text{Mol P/min/g DNS}$) der Nucleosid- $\longrightarrow$
(Fortsetzung auf Seite 21)

VERSUCHS-GRUPPEN		Ribonucleosid-5'-triphosphate					$\longleftarrow$ SUBSTRATE $\longrightarrow$	
		ATP	GTP	ITP	CTP	UTP		
Kontrolle (1)	Messung	45 24,4 33,7	47,6 44,4	90,2 88,7	44,4 24,4 23,1	58 54,1		
	Mittelwert	34,4	46	89,5	30,6	56,1		
Adrenal- ektomie (2)	Messung	88,6 37,8 42,8	160 145,7	225,1 255,3	125,2 64,1 41,8	186,9 201		
	Mittelwert	56,4	152,9	240,4	77	194		
	Zeichen-test	+	+	+	+	+		
L-Thyro- xingabe (3)	Messung	40,2 27,1	32,2 18,6	71,1 64,6	36 25,4	67,3 53,4		
	Mittelwert	33,7	25,4	67,9	30,7	60,4		
	Zeichen-test	-	-	-	+	+		
3'-Me-DAB- Gabe (4)	Messung	48 43,1	72,1 67,9	127,1 163,8	33,9 46,3 25,6	100,3 115,4		
	Mittelwert	45,6	70	145,5	35,3	107,9		
	Zeichen-test	+	+	+	+	+		

Bei einem Wert dieses Quotienten von > 1 ist eine Aktivitätssteigerung der NTP-ase für das betreffende Substrat eingetreten, bei einem Wert < 1 eine Aktivitätsminderung.
(Fortsetzung auf Seite 21)

triphosphatase A aus Rattenleberzellkernen (noch: TABELLE 5 der Versuchsreihe I und Zeichentest

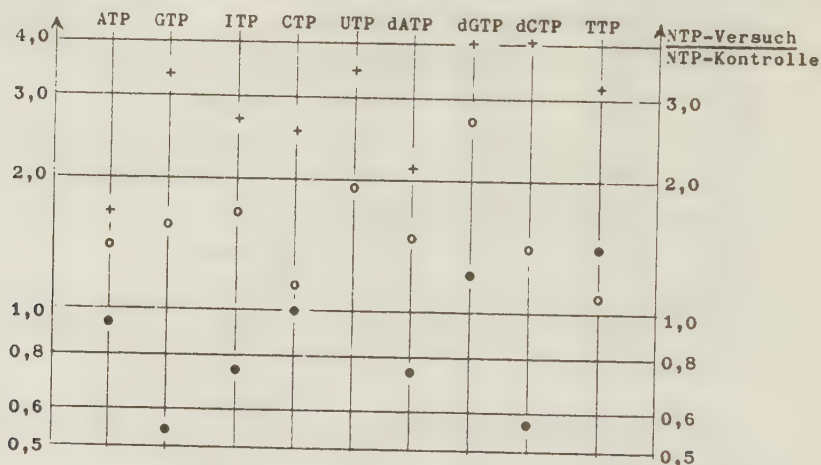
(Fortsetzung von Seite 20)

← SUBSTRATE →					VERSUCHS-GRUPPEN
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate					
dATP	dGTP	dCTP	TTP		
57,6	78,3	34,7	33	Messung	Kontrolle (1)
33	67,3	16,2	17,7		
49		23,6	28,7		
46,5	72,8	24,8	26,5	Mittelwert	
132,5	281,4	105,5	85	Messung	Adrenal- ektomie (2)
87,4	295,5	90,5	75,8		
68,3					
96,1	288,5	98	80,4	Mittelwert	
+	+	+	+	Zeichen- test	
58	85,5	8,5	37,7	Messung	L-Thyroxin- Gabe (3)
24,6	88,2	19,5	31,4		
22,9					
35,2	86,9	14	34,6	Mittelwert	
-	+	-	+	Zeichen- test	
74,9	190,3	36,7	29,6	Messung	3'-Me-DAB- Gabe (4)
55,4	195	29,6	27,1		
65,2	192,7	33,1	28,4	Mittelwert	
+	+	+	+	Zeichen- test	

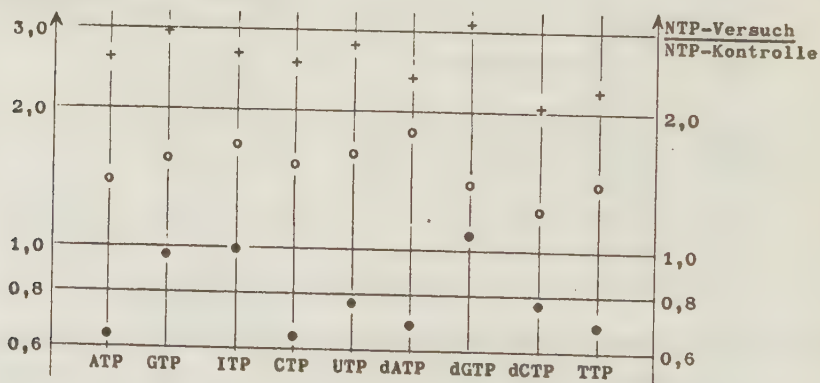
So ergibt sich zum Beispiel für das Substrat ATP in der Gruppe der adrenaletomierten Tiere ein Quotient von $56,4 : 34,4 = 1,64$ und damit eine Aktivitätssteigerung der NTP-ase A für dieses Substrat.

ABBILDUNG 1: Aktivitätsänderungen^(a) der Nucleosidtriphosphatase A und B unter experimentellen Bedingungen^(b)

Nucleosidtriphosphatase A



Nucleosidtriphosphatase B



(a) Quotient aus dem Mittelwert der Substratspaltung in der Versuchsgruppe und Kontrollgruppe

(b) ● Thyroxingabe + Adrenalectomie ○ 3'-Me-DAB-Gabe

In Abbildung 1 sind die Quotienten in einer graphischen Darstellung in logarithmischem Maßstab wiedergegeben. Die zu den einzelnen Substraten gehörenden Quotienten der Versuchsgruppen sind übereinander eingetragen. Die zur Kontrollgruppe gehörenden Quotienten haben naturgemäß alle den Wert 1 und liegen auf der durch $\log 1$ gezogenen Geraden.

Den im Vorzeichentest gefundenen Ergebnissen entsprechend zeigt auch die graphische Darstellung in Gruppe 2 und 4 eine Enzymaktivitätssteigerung, sie zeigt aber außerdem, daß die Spaltung aller Substrate durch die NTP-ase A adrenaletomierter Tiere deutlich stärker ist als bei den mit 3'-Me-DAB behandelten Ratten. Die Werte für die Gruppe 3 liegen teils über teils unter der Kontrolle, und es fällt bei ihnen sowie den beiden anderen Gruppen auf, daß sich innerhalb einer Versuchsgruppe nicht alle Werte im gleichen Verhältnis zur Kontrolle verändert haben.

b) Enzymaktivitäten der NTP-ase B, Zeichentest und Aktivitätsänderung gegenüber der Kontrolle:

In Tab.6 und Abb.1 sind die Ergebnisse für die NTP-ase B in gleicher Weise dargestellt, wie im vorangegangenen Abschnitt für die NTP-ase A. Der Zeichentest ergibt eine „stark gesicherte“ Enzymaktivitätssteigerung bei den adrenaletomierten Tieren und den mit 3'-Me-DAB behandelten Ratten, während sich bei der Versuchsgruppe 3, im Unterschied zu den Ergebnissen bei der NTP-ase A, mit 5% Wahrscheinlichkeit „schwach gesichert“ eine Aktivitätsminderung feststellen läßt.

In der graphischen Darstellung der relativen Enzymaktivitätsänderungen fällt, wie bei der NTP-ase A, ein in Gruppe 2 stärkerer Aktivitätsanstieg als in Gruppe 4 auf. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der NTP-ase A steht der fast gleichmäßige Anstieg der Enzymaktivität bei allen Substraten der Gruppe 2 und 4, und darüber hinaus der deutliche Abfall der Werte in Gruppe 3, wobei nur die Substrate GTP, ITP und dGTP eine Ausnahme darstellen.

c) Substratspezifitätsänderungen der NTP-asen A und B:

In dieser Arbeit interessiert vor allem die Frage, ob und wie sich unter bestimmten experimentellen Bedingungen das in früheren Arbeiten [5, 25, 27, 29] gefundene charakteristische Verhalten der NTP-asen gegenüber den einzelnen Substraten der Ribonucleosid- und Desoxyribonucleosidtriphosphat-Reihe ändert. Solche Änderungen sind Substratspezifitätsänderungen.

TABELLE 6: Aktivität ($\mu\text{Mol P/min/g DNS}$) der Nucleosid- $\longrightarrow$

(Fortsetzung auf Seite 25)

VERSUCHS- GRUPPEN		Ribonucleosid-5'-triphosphate					SUBSTRATE $\longrightarrow$	
		ATP	GTP	ITP	CTP	UTP		
Kontrolle (1)		74,3	96,1	112,2	47,9	94,9		
	Messung	50,2	102	98,4	48,8	94,4		
		47,6						
	Mittel- wert	57,4	99	105,3	48,4	94,7		
Adrenal- ektomie (2)		155,8	283,4	281,4	107,4	307,5		
	Messung	138,4	293,5	277,4	130,4	229,1		
						246,2		
	Mittel- wert	147,1	288,5	279,4	119	260,9		
	Zeichen- test	+	+	+	+	+		
L-Thyro- xingabe (3)		40,7	100	100,4	45,7	81,3		
	Messung	32,2	91,6	110,6	16,1	63,5		
	Mittel- wert	36,5	95,8	105,5	30,9	72,4		
	Zeichen- test	-	-	+	-	-		
3'-Me-DAB- gabe (4)		74,3	142,3	145,9	58,7	114,7		
	Messung	78	157,6	222	82,5	168,5		
				142,7		145,1		
	Mittel- wert	76,2	150	169,5	70,2	142,8		
	Zeichen- test	+	+	+	+	+		

Die relative Spaltung eines NTP, die Substratspezifität, ergibt sich durch Bildung eines Quotienten aus den in Tab.5 und 6 dargestellten Mittelwerten der Substratspaltung (NTP-Spaltung) und der ATP-Spaltung:

(Fortsetzung auf Seite 25)

triphosphatase B aus Rattenleberzellkernen (noch: TABELLE 6 der Versuchsreihe I und Zeichentest

(Fortsetzung von Seite 24)

← SUBSTRATE →						VERSUCHS- GRUPPEN
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate						
dATP	dGTP	dCTP	TTP			
50	99,7	60,6	29,6			Kontrolle (1)
66,1	111,2	50,2	34	Messung		
42,8						
53	105,5	55,4	31,8	Mittelwert		
129,6	327,6	122,6	101,1			Adrenal- ektomie (2)
119,4	307,5	102,9	65,1	Messung		
			51			
124,5	317,6	112,8	72,4	Mittelwert		
+	+	+	+	Zeichen- test		
44,9	121,1	70,8	41,1			L-Thyroxin- Gabe (3)
27,1	104,5	35,3	14,4	Messung		
		22,9	8,5			
36	112,8	43	21,3	Mittelwert		
-	+	-	-	Zeichen- test		
84,7	148,5	73,3	48,5			3'-Me-DAB- Gabe (4)
103	132	59,9	37,3	Messung		
93,9	140,3	66,6	42,9	Mittelwert		
+	+	+	+	Zeichen- test		

NTP-Spaltung in der Versuchsgruppe

ATP-Spaltung in der Versuchsgruppe

Als Beispiel sei der Wert für die Spaltung von ITP durch

die NTP-ase A der Kontrollkerne angegeben, der 89,5/34,4 = 2,6 beträgt und somit eine 2,6-fach stärkere Hydrolyse von ITP als von ATP zum Ausdruck bringt.

In Tab.7 sind die Werte für die relative Spaltung der Substrate durch die NTP-asen A und B der Versuchsreihe I wiedergegeben. Es zeigen sich mitunter recht deutliche Abweichungen von den Kontrollwerten. Diese Abweichungen können durch weitere Quotientenbildung als Substratspezifitätsänderung zahlenmäßig erfaßt werden.

TABELLE 7: Substratspezifität (NTP-Spaltung / ATP-Spaltung) der Nucleosidtriphosphatasen A und B unter experimentellen Bedingungen (I)

VERSUCHSGRUPPEN					
Nucleosidtriphosphatasen	Substrate	Kontrolle (1)	Adrenal- ektomie (2)	L-Thyroxin- Gabe (3)	3'-Me-DAB- Gabe (4)
NTP-ase A	ATP	1,00	1,00	1,00	1,00
	GTP	1,34	2,71	0,75	1,54
	ITP	2,6	4,28	2,01	3,19
	CTP	0,9	1,36	0,91	0,77
	UTP	1,63	3,43	1,79	2,37
	dATP	1,35	1,7	1,05	1,43
	dGTP	2,11	5,05	2,58	4,23
	dCTP	0,72	1,79	0,42	0,73
	TTP	0,77	1,43	1,03	0,62
	ATP	1,00	1,00	1,00	1,00
NTP-ase B	GTP	1,73	1,96	2,62	1,99
	ITP	1,84	2,01	2,90	2,33
	CTP	0,84	0,81	0,85	0,93
	UTP	1,65	1,76	1,96	1,87
	dATP	0,92	0,85	0,99	1,23
	dGTP	1,84	2,16	3,08	1,52
	dCTP	0,97	0,76	1,18	0,76
	TTP	0,56	0,49	0,58	0,56

Aus dem Verhältnis der Substratspezifität in der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe

$$\frac{\text{NTP (Versuchsgruppe)}}{\text{ATP (Versuchsgruppe)}} : \frac{\text{NTP (Kontrollgruppe)}}{\text{ATP (Kontrollgruppe)}}$$

wurden sie ermittelt und in Tab.8 wiedergegeben. Liegt der Wert bei 1, so bedeutet das, daß das Verhältnis der Substratspaltung zur ATP-Spaltung in Kontrollgruppe und Versuchsgruppe gleich ist, wobei die Absolutaktivitäten gleich, größer oder kleiner sein können; ist der Wert größer als 1, haben wir eine Substratspezifitätsänderung, die durch relative Zunahme der Spaltung des Substrats NTP bedingt sein kann, durch relative Abnahme der ATP-Spaltung oder durch beides gleichzeitig; bei allen Werten unter 1 kann entsprechend die Substratspezifitätsänderung auf einem relativen Zurückgehen der NTP-Spaltung, einem relativen Anstieg der ATP-Spaltung oder beidem beruhen. Als Beispiel einer solchen Berechnung der Substratspezifitätsänderung sei die GTP-Spaltung in Versuchsgruppe 3 angegeben:

$$\frac{25,4}{33,7} : \frac{46}{34,4} = 0,56$$

Bei der Beurteilung der Tab.8 ergibt sich das Problem, festzulegen, wie groß eine Änderung mindestens sein muß, damit man von einer echten Substratspezifitätsänderung sprechen kann, die nicht durch die Fehlerbreite der Meßmethode bedingt sein soll. Da die Festlegung eines solchen Grenzwertes in unserem Fall weder experimentell noch statistisch möglich war, entschlossen wir uns, rein empirisch zu verfahren. Wir ließen nur Substratspezifitätsänderung von $>1,30$ und $<0,70$ als solche gelten, also eine $\pm 0,30$ -fache bzw. 30%ige Abweichung der Substratspezifität von Kontrolle und Versuchsgruppe. Diese Begrenzung schien uns ausreichend, da nur zu einem geringen Teil die Werte der 1. und 2. Messung (Tab.3 und 4) um den Faktor 0,25 voneinander abwichen. Auch im Falle größerer Abweichungen konnte sich ein Fehler nur zur Hälfte bei der Substratspezifitätsberechnung auswirken, da drei Messungen durchgeführt und Mittelwerte gebildet wurden. Ferner überprüften wir jede wertbare Substratspezifitätsänderung einzeln, ob Anhaltspunkte für meßbedingte Fehler zu finden waren.

Unter Berücksichtigung der voranstehenden Ausführungen können wir feststellen, daß bei der NTP-ase A in den Lebern adrenaletomierter Ratten eine Spezifitätsänderung für die Substrate GTP, ITP, CTP, UTP, dGTP, dCTP und TTP eingetreten ist, bei den mit L-Thyroxin behandelten Tieren für GTP, dCTP und TTP und bei den mit 3'-Me-DAB gefütterten Tieren für UTP und dGTP.

TABELLE 8: Substratspezifitätsänderungen (Substratspezifität der Versuchsgruppe/Substratspezifität der Kontrollgruppe) der Nucleosidtriphosphatasen A und B unter experimentellen Bedingungen (I)

Nucleosidtri- phosphatasen	Substrate	VERSUCHSGRUPPEN		
		Adrenal- ektomie (2)	L-Thyroxin- Gabe (3)	3'-Me-DAB- Gabe (4)
NTP-ase A	ATP	1,00	1,00	1,00
	GTP	1,99	0,56	1,15
	ITP	1,64	0,77	1,23
	CTP	1,51	1,01	0,86
	UTP	2,10	1,10	1,46
	dATP	1,26	0,78	1,06
	dGTP	2,40	1,22	2,00
	dCTP	2,49	0,58	1,01
	TTP	1,86	1,34	0,81
NTP-ase B	ATP	1,00	1,00	1,00
	GTP	1,13	1,51	1,15
	ITP	1,16	1,58	1,21
	CTP	0,96	1,01	1,11
	UTP	1,06	1,19	1,13
	dATP	0,92	1,08	1,34
	dGTP	1,17	1,67	0,83
	dCTP	0,79	1,22	0,78
	TTP	0,96	1,03	1,00

Die Spezifitätsänderung, die nach Adrenalectomie für alle Substrate außer dATP eintritt, bedarf besonderer Erwähnung. Es scheint in diesem Falle unter Berücksichtigung der Abb.1 die Spezifitätsänderung der Substrate vor allen Dingen durch eine relative Abnahme der ATP-Spaltung bedingt zu sein, worauf im Abschnitt 3, Seite 37, zurückzukommen sein wird.

Bei der NTP-ase B sind andere Substrate als bei der NTP-ase A von der Spezifitätsänderung betroffen, und die Zahl der Spezifitätsänderungen ist insgesamt geringer. Nach Adrenalectomie finden sich keine Veränderungen, nach L-

Thyroxininjektion eine Spezifitätsänderung für GTP, ITP und dGTP und nach 3'-Me-DAB-Gabe für dATP.

Diese Aussagen über die Veränderung der Substratspezifität, das sei hier noch einmal betont, beruhen auf willkürlich gesetzten Grenzen, so daß sie nicht ohne weiteres eine Verallgemeinerung rechtfertigen.

2. THIOACETAMID-GABE UND FÜTTERUNGSVERSUCHE

a) Enzymaktivitäten der NTP-asen A und B, Zeichentest und Aktivitätsänderung gegenüber der Kontrolle:

In Tab.9 und 10 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe II wiedergegeben, die aus einer Kontrolle (1), der Thioacetamid-Gabe (2), der Proteinmangelernährung (3) und der Wiederauffütterung nach Proteinmangelernährung (4) bestand. Der Zeichentest ergibt sowohl für die NTP-ase A als auch für die NTP-ase B eine Aktivitätsminderung in Versuchsgruppe 2 und 3 und in Gruppe 4 keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Für Versuchsreihe II veranschaulicht wiederum die graphische Darstellung der Abb.2 die quantitative Änderung der Spaltung der einzelnen Substrate in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigt sich, daß die Aktivitätsminderung sowohl für die NTP-ase A als auch B nach Proteinmangelernährung um wenigstens größer ist als nach Thioacetamid-Gabe. Nur das Substrat TTP macht eine Ausnahme, da seine Spaltung nach Thioacetamid-Gabe für beide Enzyme unter dem Wert der Proteinmangelernährung liegt.

Wie in Versuchsreihe I fällt auf, daß bei der NTP-ase B die Aktivitätsänderungen in einer Versuchsgruppe für alle Substrate auf fast gleichem Niveau liegen, während sie bei der NTP-ase A größere Differenzen zeigen.

b) Substratspezifitätsänderungen der NTP-asen A und B:

Die Substratspezifitäten der NTP-ase A sind in Tab.11, die Substratspezifitätsänderungen in Tab.12 wiedergegeben. Unter Thioacetamid-Gabe hat sich bei der NTP-ase A die Spezifität der GTP- und dCTP-Spaltung geändert, nach Proteinmangelernährung die Spezifität von UTP und dCTP und bei Wiederauffütterung nach Proteinmangelernährung von GTP, ITP, CTP und dGTP. Für die NTP-ase B ergibt sich in Gruppe 2 eine Spezifitätsänderung bei CTP und TTP, in Gruppe 3 bei CTP und TTP und in Gruppe 4 keine Spezifitätsänderung.

Die Substratspezifitätsänderungen der NTP-ase A bei Wiederauffütterung nach Proteinmangel sind offensichtlich wie nach Adrenalektomie vor allem durch eine relative Zunahme der ATP-Spaltung bedingt.

TABELLE 9: Aktivität ($\mu\text{Mol P/min/g DNS}$) der Nucleosid- $\longrightarrow$
(Fortsetzung auf Seite 31)

VERSUCHS-GRUPPEN		← SUBSTRATE →				
		ATP	Ribonucleosid-5'-triphosphate			UTP
Kontrolle (1)	Messung	34,6 32,3	99,1 107,1	57,7 75	45,3 35,4	69,2 61,2
	Mittelwert	33,4	103,1	66,4	40,3	65,2
Thio- acetamid- gabe (2)	Messung	23,9 10,2 26,1	84,2 94,2	45,8 32,6 35,7	25,5 19,8	49,5 33,8 40,2
	Mittelwert	20,1	89,2	38	22,7	41,2
	Zeichen- test	-	-	-	-	-
Protein- mangel- ernährung (3)	Messung	23,8 18,2	57,8 51,8	33 27,4	24,1 19,7	21,4 25,3
	Mittelwert	21	54,8	30,2	21,9	23,4
	Zeichen- test	-	-	-	-	-
Wieder- auffütte- rung nach Protein- mangel (4)	Messung	49,6 45,2	111,8 87,8	56,5 58,8	36,1 42,2	67,8 64
	Mittelwert	47,4	99,8	57,7	39,2	65,9
	Zeichen- test	+	-	-	-	+

triphosphatase A aus Rattenleberzellkernen (noch TABELLE 9 der Versuchsreihe II und Zeichentest

(Fortsetzung von Seite 30)

← SUBSTRATE → Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate				VERSUCHS- GRUPPEN	
dATP	dGTP	dCTP	TTP		
39,5	82,3	21,1	36,9	Messung	(1)
50,8	86,5	26,5	44,3		
45,2	84,4	23,8	40,6		
31,9	64,3	25,3	25,3	Messung	(2)
22,4	35,7	23,6	10,8		
30	33,8		19,2		
28,1	44,3	24,4	18,4	Mittelwert	(3)
-	-	+	-	Zeichen-test	
28,5	39,9	18,8	24,7	Messung	
27,1	37,1	21,7	25,3	Mittelwert	(4)
27,8	38,5	20,3	25,0		
-	-	-	-		
55,2	63,5	32,6	42,6	Messung	(5)
50,9	69,6	35,3	38,3		
53	66,5	34	40,4		
+	-	+	-	Zeichen-test	

TABELLE 10: Aktivität ($\mu\text{Mol P/min/g DNS}$) der Nucleosid- $\longrightarrow$
(Fortsetzung auf Seite 33)

VERSUCHS-GRUPPEN		← SUBSTRATE → Ribonucleosid-5'-triphosphate				
		ATP	GTP	ITP	CTP	UTP
Kontrolle (1)	Messung	36,5 57,8 54,3	55,8 79 89,4	99,1 84,3	47,7 52,7	47,3 81,6 87,5
	Mittelwert	49,5	74,7	91,7	50,2	72,1
Thio- acetamid- gabe (2)	Messung	25,9 30	53,7 42,7	48,8 39,6	18,8 19,8	40,9 21,7 28,1
	Mittelwert	28	48,2	44,2	19,3	30,2
	Zeichen- test	-	-	-	-	-
Protein- mangel- ernährung (3)	Messung	26,5 26,5	41 30	39 34,9	17,9 19,4	22,1 34,9 22,1
	Mittelwert	26,5	35,5	36,9	18,6	26,3
	Zeichen- test	-	-	-	-	-
Wieder- auffütte- rung nach Protein- mangel (4)	Messung	43,6 71,4 51	64,3 79,2	84,5 91,2	40,6 52,7	67,4 83
	Mittelwert	55,3	71,8	87,8	46,6	75,2
	Zeichen- test	+	-	-	-	+

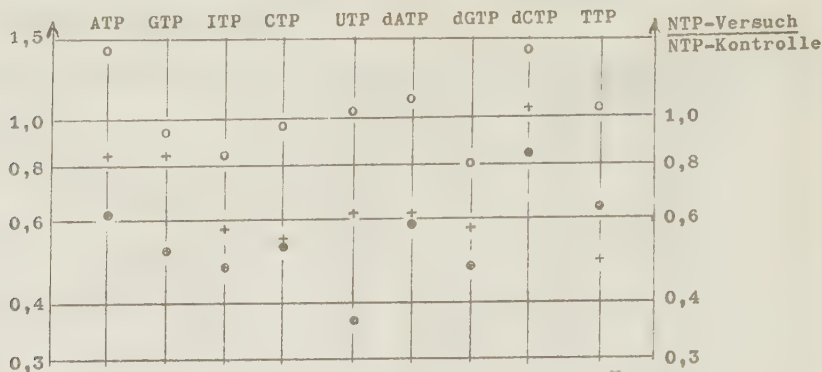
triphosphatase B aus Rattenleberzellkernen (noch TABELLE 10 der Versuchsreihe II und Zeichentest

(Fortsetzung von Seite 32)

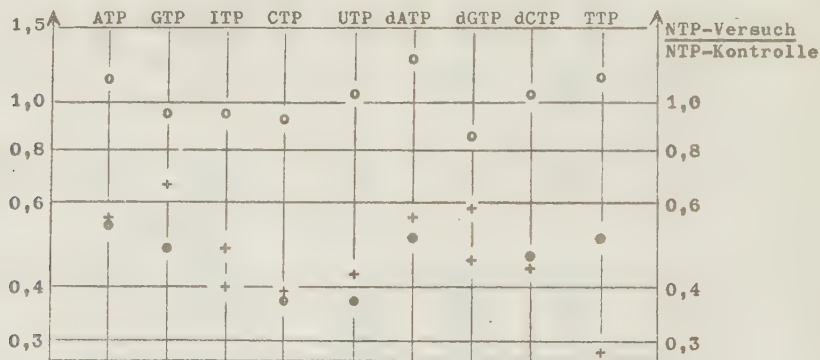
← SUBSTRATE →					
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate				VERSUCHS-	
dATP	dGTP	dCTP	TTP		GRUPPEN
34,1	78,4	47,7	19,6		
60,8	81,6	52,7	35	Messung	
58,4			40,1		
51,1	80	50,2	31,6	Mittelwert	(1)
30,7	44,7	31,7	13,8		
26,1	47,8	9,6	5,7	Messung	
		25,6	8,4		
28,4	46,2	22,3	9,3	Mittelwert	(2)
-	-	-	-	Zeichen-	
				test	
23,7	35,4	23,2	16,6		
27,1	36,1	22,3	11,9	Messung	
			18,8		
25,4	35,8	22,8	15,8	Mittelwert	(3)
-	-	-	-	Zeichen-	
				test	
59,6	62,6	47	45,7		
64,3	71,4	56,2	33,5	Messung	
			31		
62	67	51,6	36,7	Mittelwert	(4)
+	-	+	+	Zeichen-	
				test	

ABBILDUNG 2: Aktivitätsänderung^(a) der Nucleosidtriphosphatase A und B
unter experimentellen Bedingungen^(b)

Nucleosidtriphosphatase A



Nucleosidtriphosphatase B



(a) Quotient aus dem Mittelwert der Substratspaltung in der Versuchsgruppe und Kontrollgruppe

(b) + Thioacetamid • Proteinmangel o Wiederauffütterung

TABELLE 11: Substratspezifität (NTP-Spaltung / ATP-Spaltung) der Nucleosidtriphosphatasen A und B unter experimentellen Bedingungen (II)

		VERSUCHSGRUPPEN			
Nucleosidtri- phosphatasen	Sub- strate	Kontrolle (1)	Thio- acet- amid- Gabe (2)	Protein- mangel- ernäh- rung (3)	Wieder- auffütte- rung nach Protein- mangel (4)
NTP-ase A	ATP	1,00	1,00	1,00	1,00
	GTP	3,09	4,45	2,61	2,06
	ITP	1,99	1,89	1,44	1,22
	CTP	1,21	1,13	1,04	0,83
	UTP	1,96	2,05	1,11	1,39
	dATP	1,35	1,40	1,32	1,12
	dGTP	2,53	2,20	1,83	1,41
	dCTP	0,71	1,21	0,97	0,72
	TTP	1,22	0,92	1,19	0,86
	ATP	1,00	1,00	1,00	1,00
	GTP	1,51	1,72	1,34	1,30
NTP-ase B	ITP	1,85	1,58	1,39	1,59
	CTP	1,02	0,69	0,70	0,85
	UTP	1,46	1,08	0,99	1,36
	dATP	1,03	1,01	0,96	1,12
	dGTP	1,62	1,65	1,35	1,21
	dCTP	1,01	0,80	0,86	0,93
	TTP	0,64	0,32	0,60	0,66

TABELLE 12: Substratspezifitätsänderungen (Substratspezifität der Versuchsgruppe/Substratspezifität der Kontrollgruppe) der Nucleosidtriphosphatasen A und B unter experimentellen Bedingungen (II)

VERSUCHSGRUPPEN				
Nucleosidtriphosphatasen	Substrate	Thioacetamid-Gabe (2)	Proteinmangelernährung (3)	Wiederauffütterung nach Proteinmangel (4)
NTP-ase A	ATP	1,00	1,00	1,00
	GTP	1,44	0,85	0,67
	ITP	0,95	0,72	0,61
	CTP	0,94	0,86	0,68
	UTP	1,05	0,57	0,71
	dATP	1,04	0,98	0,83
	dGTP	0,87	0,72	0,55
	dCTP	1,71	1,36	1,00
	TTP	0,75	0,98	0,70
	=====	=====	=====	=====
NTP-ase B	ATP	1,00	1,00	1,00
	GTP	1,14	0,89	0,86
	ITP	0,85	0,75	0,86
	CTP	0,68	0,69	0,83
	UTP	0,74	0,68	0,93
	dATP	0,98	0,93	1,09
	dGTP	1,01	0,83	0,75
	dCTP	0,79	0,85	0,93
	TTP	0,50	0,93	1,03

3. ZUSAMMENSTELLUNG DER SUBSTRATSPEZIFITÄTSÄNDERUNGEN ALLER VERSUCHSGRUPPEN NACH DER CHEMISCHEN KONSTITUTION DER SUBSTRATE

In Tab.13 und 14 sind die Spezifitätsänderungen zusammengestellt, die wir als wertbar ansehen. Um eventuelle Zusammenhänge zwischen Spezifitätsänderungen und chemischer Konstitution der Substrate festzustellen, ist in Tab.13 nach Zuckeranteil und Basenanteil aufgegliedert worden, in Tab.14 nach Substitution in 6-Stellung der Basen. Die Vermutung, daß die Substratspezifitätsänderungen der NTP-ase A nach Adrenalektomie und Wiederauffütterung nach Proteinmangel durch eine relative Zunahme der ATP-Spaltung bedingt seien, fand in diesen Tabellen Berücksichtigung. In beiden Fällen ist ATP als Substrat mit veränderter Spezifität aufgeführt.

Bei der Aufgliederung nach dem Zuckeranteil der Substrate ergibt sich kein Anhaltspunkt für ein gesetzmäßiges Verhalten der Spezifitätsänderungen im Sinne einer wiederkehrenden Gruppierung von Nucleosidtriphosphaten mit gleichem Basenanteil und verschiedenem Zuckeranteil z.B. GTP-dGTP, ATP-dATP etc. oder unterschiedlichem Basen- und Zuckeranteil z.B. GTP-dCTP, UTP-dGTP. Bei der NTP-ase A findet sich in 4 Versuchsgruppen eine gleichzeitige Substratspezifitätsänderung von Ribose-NTP und Desoxyribose-NTP und in 2 Versuchsgruppen eine Änderung allein für ein Ribose-NTP als Substrat, wobei wir allerdings in beiden Fällen weitere Spezifitätsänderungen nicht ausschließen können. Bei der NTP-ase B sehen wir alle 4 Möglichkeiten eingetreten: keine Spezifitätsänderungen in einer Gruppe, die Änderung allein bei einem Ribose-NTP, allein bei einem Desoxyribose-NTP und gemeinsam bei Substraten mit unterschiedlichem Zuckeranteil.

Auch die Unterteilung nach Purin- und Pyrimidinbasen läßt keine Abhängigkeit der Spezifitätsänderungen von der chemischen Konstitution der NTP erkennen. Auffallend ist allerdings, daß sich Spezifitätsänderungen von ATP, UTP und dCTP nur bei der NTP-ase A finden und von CTP und dATP nur bei der NTP-ase B.

Was eine eventuelle Bedeutung der Substitution in 6-Stellung betrifft, so ergibt sich folgendes:

Bei der NTP-ase A sowie B sind alle 3 möglichen Kombinationen aufgetreten - Veränderung bei 6-Hydroxy-Substraten allein, bei 6-Amino-Substraten allein und bei beiden Substraten gemeinsam - und damit keine Konstitutionsabhängigkeit feststellbar.

TABELLE 13: Aufgliederung der Substratspezifitätsänderungen nach dem Zucker- und Basenanteil der Substrate

Nucleosidtri-phosphatasen	Versuchsgruppe	Riboside		Desoxyriboside	
		Purin	Pyrimidin	Purin	Pyrimidin
NTP-ase A	Adrenalektomie	ATP	-	-	-
	L-Thyroxingabe	GTP	-	-	dCTP, TTP
	3'-Me-DAB-Gabe	-	UTP	dGTP	-
	Thioacetamidgabe	GTP	-	-	dCTP
	Proteinmangel- ernährung	-	UTP	-	dCTP
	Wiederauffütte- rung nach Proteinmangel	ATP	-	-	-
NTP-ase B	Adrenalektomie	-	-	-	-
	L-Thyroxingabe	GTP, ITP	-	dGTP	-
	3'-Me-DAB-Gabe	-	-	dATP	-
	Thioacetamidgabe	-	CTP	-	TTP
	Proteinmangel- ernährung	-	CTP	-	-
	Wiederauffütte- rung nach Proteinmangel	-	-	-	-

TABELLE 14: Aufgliederung der Substratspezifitätsänderungen nach der Substitution in 6-Stellung des Basenanteils der Substrate

Nucleosidtri-phosphatasen	Versuchsgruppe	- 6-Hydroxy -	- 6-Amino -
NTP-ase A	Adrenalektomie	-	ATP
	L-Thyroxingabe	GTP, TTP	dCTP
	3'-Me-DAB-Gabe	UTP, dGTP	-
	Thioacetamidgabe	GTP	dCTP
	Proteinmangelernährung	UTP	dCTP
	Wiederauffütterung nach Proteinmangel	-	ATP
NTP-ase B	Adrenalektomie	-	-
	L-Thyroxingabe	GTP, ITP, dGTP	-
	3'-Me-DAB-Gabe	-	dATP
	Thioacetamidgabe	TTP	CTP
	Proteinmangelernährung	-	CTP
	Wiederauffütterung nach Proteinmangel	-	-

DISKUSSION

I. METHODENKRITIK

A) Ausgangsmaterial

1. BEHANDLUNG DER VERSUCHSTIERE

Es soll zu Anfang darauf hingewiesen werden, daß die Absolutwerte der Enzymaktivitäten und die Substratspezifitäten in Versuchsreihe I und II voneinander abwichen und beide Versuchsreihen deshalb nicht direkt miteinander verglichen werden konnten. Sie unterschieden sich in der Versuchsanordnung durch die pro Zellkernpräparation verwandte Zahl von Ratten, die geschlechtliche Zusammensetzung des Tiermaterials und die Tierstämme.

Die von Dr. REID in London durchgeführten Experimente wurden pro Versuchsgruppe an 20 männlichen Ratten vom Albino-Stamm Chester Beatty ausgeführt. Bei den Versuchen im Institut von Prof. SIEBERT in Mainz fanden jeweils 40 Ratten, je zur Hälfte männliche bzw. weibliche Tiere, vom Sprague-Dawley-Stamm Verwendung.

Die experimentelle Beeinflussung der Ratten wurde unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, Veränderungen an Grundfunktionen des Zellkerns - z.B. der genetischen Informations-Weitergabe und der Teilung der Zelle - zu provozieren, um ihre Wirkung auf die Aktivität der NTP-asen beobachten zu können.

Es wurden als Beispiele von Hormoneffekten am Zellkern Thyroxingabe und Adrenalektomie ausgewählt: Thyroxingabe als Beispiel einer gesteigerten Hormonzufuhr, Adrenalektomie als Beispiel eines Hormonmangels. TATA und WIDNELL ¹³⁶ konnten an Rattenleberzellkernen zeigen, daß die einmalige Gabe von Trijodthyronin in vivo eine Steigerung der Aktivität der DNS-abhängigen RNS-Polymerase und der Zellkern-RNS bewirkt.

Der Gipfel der Reaktion ist etwa 42 - 45 Stunder nach Applikation des Hormons erreicht. Alle Daten sprechen dafür, daß die initiale Zellwirkung des Thyroxins mit der Regulation der genetisch gesteuerten Proteinsynthese verbunden ist. Eine veränderte DNS-Synthese oder -Spaltung wurde bei diesen Versuchen nicht beobachtet.

Unsere Versuchsanordnung entspricht der von TATA und WID-NELL mit dem Unterschied, daß L-Thyroxin gespritzt wurde und die Ratten nicht thyreoidektomiert waren.

Ein Mangel an Nebennierenhormonen, experimentell erzeugt durch Adrenalektomie, führt nach REID und STEVENS [20] zu keinem veränderten Einbau von radioaktivmarkierter Orotsäure in DNS und RNS der Zellkernfraktion und 3 - 4 Tage nach der Operation zu keinem veränderten DNS-Gehalt von Rattenleberzellkernen [18, 21]. Danach setzt ein Anstieg des DNS-Gehaltes ein.

Von 3'-Me-4'-DAB (Buttergelb) und Thioacetamid ist bekannt, daß sie in Rattenleber zur Proliferation der Gallengangszellen, einem Cholangiocarcinom, führen.

Nach Verfütterung von Buttergelb wurde ein Anstieg der Zellkernzahl und eine Zunahme des Zellkern-Stickstoff beobachtet [20]. Dem geht in vitro ein vermehrter Einbau von ^{14}C -Glycin in die Zellkernproteine parallel [20]. HAWTREY und NOURSE [9] bekamen nach einmaliger Injektion einer hohen Dosis 3'-Me-DAB für den Einbau von ^{14}C -Leucin in Rattenleberzellkerne gleiche Befunde, was sie im Sinne der Proteinsynthesesteigerung des Zellkerns deuteten. Bei der Bestimmung des DNS- und RNS-Gehaltes pro Zellkern durch Messung des Nucleinsäure-Phosphors fanden REES und ROWLAND [22] für die ersten 2-3 Wochen nach der Buttergelb-Gabe niedrigere Werte als bei den Kontrolltieren, was sie vor allem auf den starken Anstieg der Zellkernzahl in dieser Zeit zurückführten. Dagegen sahen sie den ^{14}C -Orotsäure- und ^{14}C -Adenin-Einbau in die Zellkern-RNS progressiv gesteigert, und HAWTREY und NOURSE [9] stellten eine Aktivitätssteigerung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase fest. Beide Befunde gemeinsam lassen sich als Ausdruck einer gesteigerten RNS-Synthese und/oder Umsatzes verstehen.

Die Daten für die ebenfalls cancerogene Thioacetamidgabe stimmen nicht in allen Punkten mit denen nach Buttergelbapplikation überein. Bei gleichbleibender Zellkernzahl in den ersten Wochen steigt der N-Gehalt der Zellkerne an, während in vitro der ^{14}C -Glycin-Einbau in die Zellproteine keine signifikante Änderung erkennen läßt [22]. REES und ROWLAND [22] und andere Untersucher [35] sahen übereinstimmend einen starken und raschen Anstieg von DNS und RNS in den Zellkernen. Die DNS-Menge erreicht innerhalb von drei Tagen das Doppelte der Kontrollwerte [35]. Nach REES und ROWLAND [22] senkt sich in vitro der Einbau von ^{14}C -Orotsäure und ^{14}C -Adenin in die RNS der Zellkerne. VILLALOBOS und Mitarbeiter [37] glauben aufgrund von Versuchen in vitro mit ^{14}C -UTP an eine gesteigerte RNS-Synthese in den Nucleoli.

Zur Beeinflussung der Zellkernfunktion bedienten wir uns ferner zweier Fütterungsversuche.

HRYNIEWIECKI [12] fand an den Rattenlebern in zwei Zellkernfraktionen - Tris-Puffer- und 0,05m-Natriumhydroxyd-Fraktion - nach Proteinmangelernährung einen RNS-Anstieg, den er als im Nucleolus lokalisiert ansah. Der DNS-Gehalt der Rattenlebern, bezogen auf die diploiden Zellen, bleibt nach HARRISON [7] konstant, sowie auch die Gesamt-Proteinmenge der Zellkerne [7, 12].

Für die Wiederauffütterung nach Proteinmangel finden sich nach sieben Tagen hinsichtlich RNS-Gehalt, Proteingehalt und neuer Proteinfraktion in den einzelnen Zellkernfraktionen die gleichen Verhältnisse wie bei den unbehandelten Kontrolltieren [12].

Wir schilderten diese biochemischen Veränderungen der Zellkerne aus folgenden Gründen etwas ausführlicher:

- 1) Wie noch später gezeigt werden soll, erfordert die Beurteilung der von uns gefundenen Enzymaktivitäten die Kenntnis eventueller Veränderungen im DNS-Gehalt der Zellkerne;
- 2) Jeder Versuch einer funktionellen Deutung unserer Meßdaten setzt die Kenntnis voraus, welche Stoffwechselveränderung der Zellkern, soweit bisher erforscht, durch obige Experimente erfährt.

2. ZELLKERNGEWINNUNG

Über die Gewinnung von Zellkernen mit Hilfe der Zellfraktionierung in organischen Lösungsmitteln liegen eine Reihe von Arbeiten vor [26, 27, 28, 30]. Sie geben unter anderem Reinheitskriterien für solche Zellkernpräparationen an und die eventuellen Veränderungen der nativen Zellkerne durch die Methode. Der RNS/DNS-Quotient der untersuchten Zellkernpräparationen war nach Adrenalektomie und 3'-Me-DAB-Gabe höher als der für normale Rattenlebern angegebene Durchschnittswert von $0,36 \pm 0,075$ [28]. Bei höheren Werten muß speziell an eine mikrosomale Verunreinigung gedacht werden [30], obgleich der Quotient auch in diesen Fällen normal sein kann, da kein fester theoretischer Wert für alle Funktionszustände der Kerne angegeben werden kann [30]. Der normale DNS-Gehalt isolierter Rattenleberzellkerne wurde von SIEBERT [26] mit $11,6 \pm 3,0\%$ des Trockengewichts der Kerne angegeben. Die teilweise höheren Werte bei unserem Material (s. Tab. 1) können positiv gewertet werden, da sie Ausdruck einer besseren Zellkernreinigung sind [30]. Umverteilungsphänomene brauchen

wegen der bekannten Schwerlöslichkeit [26] der NTP-asen nicht in Betracht gezogen zu werden.

Wie an anderer Stelle erwähnt, wurde von einer Versuchsgruppe jeweils nur eine Zellkernpräparation hergestellt. Der DNS-Gehalt und der RNS/DNS-Quotient der Zellkerne, die langjährigen Erfahrungen mit dieser Methode der Zellkernherstellung und ihre frühere Anwendung bei Untersuchungen von Zellkernenzymen machen es unwahrscheinlich, daß Enzymaktivitätsänderungen in dem beobachteten Ausmaß präparationsbedingt sein können, und lassen die Verwendung einer Zellkernpräparation für unsere Zwecke als hinlänglich genau erscheinen.

B. Eigene Untersuchungen

1. ENZYMCHARAKTER DER NTP-ASEN UND REAKTIONSGLEICHUNG

In ihrer ersten umfassenden Untersuchung der beiden Nucleosidtriphosphatasen in Schweinenierenzellkernen haben FISCHER, SIEBERT und ADLOFF [5] mit Hilfe eines optischen Testes gesichert, daß es sich bei der beobachteten ATP-Spaltung durch Zellkerne um eine echte enzymatische Reaktion handelt nach Art einer ATP-Phosphohydrolyse. Nebenreaktionen, die Phosphat liefern, das nicht aus endständiger Bindung in ATP stammt, - etwa durch das Zusammenwirken von Myckinase und 5'-Nucleotidase - und die Kooperation zweier Enzymreaktionen, durch die in der Bilanz eine ATP-Spaltung vorgetäuscht wird, konnten durch den optischen Test unwahrscheinlich gemacht werden.

Folgende Reaktionsgleichung der ATP- und Nucleosidtriphosphatspaltung durch die NTP-asen wird angenommen:



Die intranucleäre Lokalisation der NTP-asen darf als sicher gelten, wie übereinstimmend elektronenoptische und biochemische Untersuchungen zeigten [1, 5, 29, 31]. SIEBERT [31] ordnete die beiden Enzyme aufgrund ihres Löslichkeitsverhaltens dem Chromatin-Raum des Zellkerns zu, und eine neuere Untersuchung [33] wies die NTP-asen auch in isolierten Nucleoli nach.

2. INKUBATIONS- UND PHOSPHATBESTIMMUNGSMETHODE

Die colorimetrische Bestimmung des freiwerdenden Orthophosphats als Maß der NTP-asen-Aktivität setzt eine stöchiometrische Substratspaltung voraus. FISCHER, SIEBERT und ADLOFF [51] wiesen für die ATP-Spaltung nach, daß ADP und Orthophosphat in Schweinenierenzellkernen in äquimolaren Mengen als Reaktionsprodukte freigesetzt werden, wenn durch die NTP-ase A nicht mehr als 4% ATP und durch die NTP-ase B nicht mehr als 10% ATP gespalten werden.

Eine Proportionalität der Enzymreaktion zu Inkubationsdauer und vorgelegter Enzymmenge besteht bis zu einer bestimmten Grenze der Substratspaltung. Für NTP-ase A sowie B liegt diese Grenze bei 8% ATP-Spaltung [29]. Proportionalitätsgrenzen für die Spaltung der anderen Substrate sind nicht bekannt. Unter den Versuchsbedingungen der Kontrollgruppen ist für alle Substrate die Proportionalität der Enzymreaktion gewahrt [34].

Da innerhalb einer Versuchsgruppe die Spaltungsrate der einzelnen Substrate voneinander abwich und mehrfach alle Enzymaktivitäten einer Versuchsgruppe wesentlich höher lagen als in der Kontrollgruppe, läßt sich nicht ausschließen, daß die uns unbekannten Proportionalitätsgrenzen überschritten wurden. Wir glauben aber nicht, daß sich die beobachteten Spezifitätsänderungen allein dadurch erklären lassen. Einmal dürften dann nicht Spezifitätsänderungen in Versuchsgruppen mit geringerer Enzymaktivität als in den Kontrollgruppen auftreten und zum andern sollten Spezifitätsänderungen bei Adrenalektomie und 3'-Me-DAB-Gabe die gleichen Substrate betreffen. Beides ist in unseren Untersuchungen nicht der Fall gewesen.

Grundsätzlich für alle Meßwerte der NTP-asen-Aktivität muß berücksichtigt werden, daß von FISCHER, SIEBERT und ADLOFF [51] in Leerwerten ohne ATP ein Schwund an Orthophosphat festgestellt wurde, der enzymatisch bedingt zu sein scheint. Auf die hier gebrauchte Enzymeinheit umgerechnet beträgt der Orthophosphatschwund etwa $5 \mu\text{Mol P/min/g DNS}$, wenn man einen DNS-Zellkerngehalt von durchschnittlich 15% zugrunde legt. Eine entsprechende Korrektur wurde nicht durchgeführt. Alle Werte sind deshalb als Minimalwerte anzusehen. Durch die für die Zellkerngewinnung benutzten Lösungsmittel tritt ein Schwund der NTP-asen-Aktivität ein [51]. Auch aus diesem Grunde sind die bestimmten Enzymaktivitäten Minimalwerte. Für die Substratspezifitätsänderungen dürfte diese Tatsache keine Bedeutung haben, da bei Korrektur der Absolutwerte aller Enzymaktivitäten die Substratspezifitäten die gleichen bleiben würden.

Schwierig war es, jeweils genau die gewünschte Menge Enzym in das Inkubationsgemisch einzubringen. Das lag daran, daß das Enzym in Form des ungereinigten Zellkernpul-

vers vorlag und bei der Aufarbeitung zur Suspension durch Homogenisieren von Hand im Glashomogenisator keine völlig gleichmäßige Verteilung und Größe der Suspensionsteilchen garantiert werden konnte. Bei den Mikromengen Zellkernsuspension, die pro Ansatz verwendet wurden, fiel diese Inhomogenität mehr als gewünscht ins Gewicht und mag der Hauptgrund für die Abweichung der Enzymaktivitätswerte der Meßwiederholungen gewesen sein.

Für die Phosphatbestimmungsmethode gelten, damit sie sicher anwendbar ist, bestimmte Grenzen des Phosphatgehalts, den eine Probe enthalten darf [40]. Sie wurden eingehalten und die übrigen geforderten Kautelen beachtet.

3. EINHEIT DER NTP-ASEN-AKTIVITÄT

Die international gebräuchliche Einheit für Enzymaktivitäten ist $\mu\text{Mol/min}$ bei 30°Celsius und mit, je nach den Erfordernissen und Versuchsmöglichkeiten verschiedenen Bezugsgrößen, z.B. g Gewebe, mg Protein, mg N. Hier ist der Bezug auf mg DNS gewählt, einmal da die Untersuchungen mit Zellkernsuspensionen durchgeführt wurden, und zum anderen in der Absicht, dadurch gleichzeitig eine Korrektur für den unterschiedlichen Reinheitsgrad der Zellkernpräparationen durchzuführen. Dieses Vorgehen scheint gerechtfertigt, da SIEBERT und Mitarbeiter [27, 28, 30] die lineare Abhängigkeit der Zellkernenzymaktivitäten vom DNS-Gehalt und RNS/DNS-Quotienten der Zellkernpräparation nachgewiesen haben. Die feste Bindung der NTP-Asen an den Chromatinraum [5, 29, 31] der Zellkerne, wahrscheinlich an Nucleoproteide, läßt ebenfalls den Bezug der Aktivitätseinheiten auf DNS sinnvoll erscheinen. Verschiebungen in der Zellkernzusammensetzung können dadurch als Ursache scheinbarer Enzymaktivitätsänderungen ausgeschaltet werden.

Allerdings muß auch beim Bezug der Enzymaktivitätseinheiten auf DNS immer daran gedacht werden, daß eine Änderung der Meßwerte nicht in jedem Fall Ausdruck einer wirklichen NTP-Asen-Aktivitätsveränderung sein muß, sondern allein durch Änderung des DNS-Gehaltes bedingt sein kann. Hierin liegt der wesentliche Vorteil der von uns gewählten Enzymaktivitätseinheit, daß einerseits das genetische Material, die DNS, bei den Funktionszuständen des Zellkerns - mit Ausnahme der Mitose - konstant bleibt und andererseits ein veränderter DNS-Gehalt des Zellkerns gut feststellbar ist. In unserem Falle ist in 2 Versuchsgruppen eine solche experimentelle Beeinflussung des DNS-Gehaltes der Zellkerne bekannt: nach 3'-Me-DAB-Gabe eine Abnahme und nach Thioacetamidfütterung eine Zunahme.

II. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

A) Substratspezifität und Substratspezifitätsänderungen

1. FRÜHERE UNTERSUCHUNGEN

Erste Daten über die Substratspezifität der NTP-asen wurden für die Spaltung von Ribonucleosid-5'-triphosphaten [5] und später von Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten [25] in Schweineinierzellkernen ermittelt. Weitere Messungen fanden an Rattenleberzellkernen statt [31, 34] und wurden auf die Untersuchung von Zellkernen regenerierender Rattenleber ausgedehnt [27, 29]. Nach Rattenleberregeneration zeigen sich bei den NTP-asen A und B deutliche Substratspezifitätsänderungen für GTP, UTP und dGTP [29].

2. DEUTUNGSMÖGLICHKEITEN DER SUBSTRATSPEZIFITÄTSÄNDERUNGEN

Es ist ein anerkanntes Prinzip der Spezifitätsuntersuchung von Enzymen, die optimalen Reaktionsbedingungen und die Substrat-Enzymkinetik eines Ferments für ein Substrat zu bestimmen und die Untersuchung der Spaltung weiterer Substrate unter gleichen Bedingungen durchzuführen [4]. Die Inkubationsbedingungen der Zellkern-NTP-asen sind für ATP ermittelt worden, und wir bezogen deshalb alle Spezifitätsangaben der Ribonucleosid-5'- und Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate auf dieses eine Substrat.

Für das Auftreten der Substratspezifitätsänderungen kommen eine Reihe verschiedener Erklärungen in Betracht. Sie lassen sich bei der vorliegenden Themastellung am besten in zwei Gruppen unterteilen im Hinblick darauf, ob man die NTP-asen als ein Enzymindividuum oder eine Enzymgruppe ansehen will. Im ersten Fall - die NTP-asen A und B als Enzymindividuen - konnte mit folgenden Faktoren als Ursachen für die Spezifitätsänderungen gerechnet werden:

- a) Die Messungen wurden infolge von Aktivitätsänderungen nicht mehr bei Substratkonzentrationen durchgeführt, bei denen die Substratspaltung während der ganzen Inkubationsdauer zur Enzymmenge und Reaktionszeit linear proportional ist:

Ein solches Überschreiten der Proportionalitätsgrenzen ließ sich nicht sicher ausschließen. Wir haben den Grund dafür bereits an anderer Stelle erwähnt und ausgeführt, daß die Spezifitätsänderungen nicht allein durch diese Tatsache zu erklären sind.

b) Veränderung der NTP-asen durch die Zellkernherstellung:

Von dem Enzym Glutaminsäuredehydrogenase ist bekannt, daß es bei Einwirkung verschiedenster Substanzen in 4 Unter-einheiten dissoziiert, seine Substratspezifität für Glutaminsäure verliert und zu einer Alanindehydrogenase wird [21]. An solche oder ähnliche Effekte während der Herstellung der Zellkerne muß gedacht werden. Die bisherigen Untersuchungen an Zellkernen, die in lipophilen Medien isoliert wurden, haben keine solche Veränderungen von Enzymproteinen gezeigt. Auch zeigten sich bisher bei Messungen der NTP-ase-Aktivität in verschiedenen Zellkernpräparationen von unbehandelten Versuchstieren keine signifikanten Änderungen der Spezifität [34].

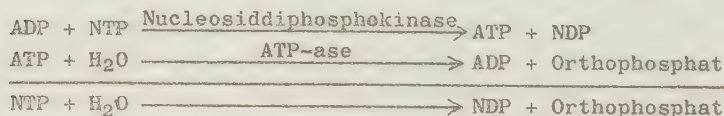
c) Experimentell bedingtes Auftreten von Effektoren:

Effektoren - sowohl Inhibitoren als auch Aktivatoren - brauchen die Aktivität eines Enzyms nicht für alle Substrate in gleichem Maße zu verändern [4] und können daher Anlaß zur Substratspezifitätsänderung geben. Als solche Wirkungsfaktoren kommen in vivo vor allem Proteine, niedermolekulare Metaboliten, Metallionen und Verschiebungen des p_H -Wertes in Frage. Metallionenverschiebungen und p_H -Änderungen in vivo im Zellkern dürften bei der NTP-asen-Aktivitätsbestimmung nicht ins Gewicht fallen, da die Metallionen, die für die NTP-asen wichtig sind, in 10000- bis 100000-fach höherer Konzentration im Inkubationsmilieu vorhanden sind als in normalen Rattenleberzellkernen [14] und das p_H -Milieu durch Puffer konstant gehalten wurde.

Die anderen genannten Substanzen können bei unseren Versuchen wirksam geworden sein. In diesem Falle müßte das Vorkommen mehrerer verschiedener Effektoren für die NTP-asen angenommen werden, da die Substratspezifitätsänderungen in allen Versuchsgruppen verschieden waren.

d) Aktivitätsänderungen oder Neuerscheinen von Enzymen, die durch Nebenreaktionen Nucleosidtriphosphate spalten und Orthophosphat freisetzen:

Es kommen dafür vor allem Nucleosiddiphosphokinasen in Frage, die in der Summengleichung scheinbar Nucleosidtriphosphate unter Orthophosphatfreisetzung spalten [29]:



SIEBERT und Mitarbeiter konnten solche Störreaktionen weitgehend ausschließen durch Zugabe von ADP in Substratmengen mit folgender Prüfung auf einen eventuellen Anstieg der Spaltungsrate eines Nucleosidtriphosphats [27] und durch enzymatische Bestimmung des endogenen ADP-Gehalts mit Hilfe von Phosphoenolpyruvat, Pyruvatkinase, DPNH und Lactatdehydrogenase [29]. Da diese Befunde an Rattenleberzellkernen unbehandelter Versuchstiere erhoben wurden, kann ohne Kontrolluntersuchung nicht die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß bei unseren Versuchen Enzyme mit derartigen Störeffekten aktiviert oder neusynthetisiert wurden. Es gilt aber für die Zellkerne behandelte und unbehandelte Ratten gleichermaßen, daß in Fällen, wo die Substratspaltung höher liegt als die ATP-Spaltung, Nebenreaktionen nicht die alleinige Ursache dafür sein können, da bei einer Folge von Enzymreaktionen die langsamste geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Mehrzahl der verschiedenen Nucleosidtriphosphate wurde schneller umgesetzt als ATP, und wir müssen deshalb auch für die anderen Substrate Enzymreaktionen im obigen Sinne für wenig wahrscheinlich halten.

e) Bildung einer neuen NTP-ase
mit veränderter Substratspezifität:

Eine durch die Experimente induzierte Bildung einer neuen NTP-ase mit veränderter Substratspezifität darf als weitere Möglichkeit nicht vergessen werden. Nach unseren Ergebnissen müßten wir dann das Vorkommen von mindestens 4 verschiedenen NTP-asen A und B annehmen.

Nimmt man den an zweiter Stelle genannten Fall an, daß die NTP-asen ein Gemisch von Enzymen mit ausgeprägter Nucleosidspezifität darstellen, bieten sich gleichfalls mehrere Deutungsmöglichkeiten der Spezifitätsänderungen an, die in unserem Zusammenhang aber von geringerem Interesse und deshalb fortgelassen sind.

Einige Untersuchungen an Rattenleberzellkernen machten das Vorkommen spezifischer NTP-asen wahrscheinlich. Auf präparativem Wege ließ sich eine ATP-asen-Aktivität, GTP-asen-Aktivität und UTP-asen-Aktivität aus teilgereinigter NTP-ase A abtrennen [27]. Versuche mit Hitzedenaturierung der Enzyme sprechen ebenfalls für diese 3 verschiedenen NTP-asen [31] und erste vergleichende Untersuchungen des pH-Optimums der UTP-, GTP-, CTP- und ATP-Spaltung durch NTP-ase A deuten ebenso auf spezifische NTP-asen [34].

Zum Schluß sei erwähnt, daß natürlich auch noch an eine Kombination zweier oder mehrerer der oben genannten potentiellen Ursachen der Substratspezifitätsänderungen gedacht werden muß.

3. SPEZIFISCHE NTP-asen

Unter den Reaktionsbedingungen der NTP-ase A zeigten sich für ATP, GTP und UTP jeweils zweimal Substratspezifitätsänderungen, für die anderen Ribonucleosid-5'-triphosphate keine Spezifitätsänderungen. Die Übereinstimmung dieses Befundes mit den vorgenannten Untersuchungen ist deutlich und ein wesentliches Argument dafür, daß die NTP-ase A mit großer Wahrscheinlichkeit als ein Gemisch spezifischer Nucleosidtriphosphatasen angesehen werden darf. Für das Auftreten der übrigen Spezifitätsänderungen glauben wir daher ebenfalls spezifische NTP-asen verantwortlich machen zu können, wenngleich andere Deutungsmöglichkeiten nicht sicher ausgeschlossen werden konnten.

Bei der NTP-ase B dürfen wir, was die Substrate der Ribonucleosidtriphosphatreihe anbetrifft, eine CTP-ase annehmen und entweder eine gemeinsame NTP-ase für GTP und ITP oder für jedes Substrat ein einzelnes Enzym. Nach Thyroxingabe ist die Spezifitätsänderung für die beiden letzten Substrate auf dem gleichen Niveau - $GTP = 1,51$; $ITP = 1,58$ -, so daß im Zusammenhang mit der engen chemischen Verwandtschaft beider Substrate der Gedanke nahe liegt, daß es ein einziges Enzym für die GTP- und ITP-Spaltung geben mag. Eine Entscheidung dieser Frage wird späteren Untersuchungen mit anderer Versuchsanordnung vorbehalten sein.

Für die Desoxyribonucleosidtriphosphate scheint es ebenfalls spezifische NTP-asen zu geben. Unter den Reaktionsbedingungen der NTP-ase A kann eine dGTP-ase, dCTP-ase und eine TTP-ase angenommen werden, unter den Versuchsbedingungen der NTP-ase B eine dATP-ase, dGTP-ase und TTP-ase. Die gleichzeitige Spezifitätsänderung der NTP-ase A für dCTP und TTP nach Thyroxingabe spricht kaum für ein einzelnes Enzym, das beide Substrate spaltet, da die berechneten Spezifitätsänderungen entgegengesetzt gerichtet sind - für dCTP = 0,58 und für TTP = 1,34.

Wie an anderer Stelle ausgeführt und durch Tabellen 13 und 14 veranschaulicht wurde, läßt sich kein Hinweis finden für eine gesetzmäßige Abhängigkeit der Spezifitätsänderungen von der chemischen Konstitution der Substrate. Dadurch gewinnt die Annahme an Wahrscheinlichkeit, daß alle postulierten NTP-asen eine ausgeprägte Spezifität für ein einziges Substrat besitzen, mit Ausnahme der GTP-ase B und ITP-ase B, die eventuell das gleiche Enzymindivuum darstellen.

Es fällt auf, daß bei der NTP-ase A zweimal eine Spezifitätsänderung der ATP-Spaltung und UTP-Spaltung beobachtet wurde, während bei der NTP-ase B in den gleichen Versuchsgruppen - Adrenalectomie, 3'-Me-DAB, Proteinmangel und Wiederauffütterung nach Proteinmangel - dreimal kein Effekt auftrat und bei Proteinmangel statt der UTP-Spaltung

die CTP-Spaltung geändert wurde. Berücksichtigt man ferner die Tatsache, daß die NTP-ase A in den 6 Versuchen keine Spezifitätsänderung der CTP-Spaltung zeigt, eine solche aber bei der NTP-ase B in zwei Fällen festgestellt wurde, so könnten diese Befunde einmal als Ausdruck unterschiedlicher funktioneller Bedeutung der NTP-asen A und B angesehen werden, zum anderen aber auch als Folge davon, daß es bei der NTP-ase B nicht für alle Substrate ein spezifisches Enzym gibt. Schließlich kann, solange nicht für alle Substrate die optimalen Reaktionsbedingungen der NTP-asen ermittelt sind und die Reinigung der Enzyme weiter fortgeschritten ist, noch nicht ausgeschlossen werden, daß die einen oder anderen hier angenommenen spezifischen NTP-asen vom Typ A und B in Wirklichkeit ein Enzym darstellen.

4. ATP-asen UND NTP-asen ANDERER ZELLOKALISATION

Substratspezifitätsuntersuchungen existieren für eine Reihe von ATP-asen anderer Zellokalisation und aus anderen Geweben [3, 8, 15, 16, 17, 23, 29]. Veränderungen der Substratspezifität wurden in vitro nach Zugabe von Effektoren beobachtet [3, 6, 8, 23]. Angaben über Substratspezifitätsänderungen nach experimenteller Beeinflussung des Zellstoffwechsels in vivo ließen sich in der Literatur nicht finden.

SACKTOR und COCHRAN [23] nehmen aufgrund von Inhibitionsversuchen an, daß es in Fliegenmuskel-Mitochondrien spezifische NTP-asen für ATP, GTP, ITP, UTP und CTP gibt. PULLMAN et al. [17] dagegen vermuten in Mitochondrien des Herzmuskels ein gemeinsames Enzym für die Spaltung von ITP, ATP, GTP und UTP. Ebenfalls auf ein Enzym glauben LEWIS und WEISSMANN [15] die Spaltung von ATP, UTP, CTP, GTP und TTP zurückführen zu können, die sie mit einer löslichen NTP-ase aus Rattenleber beobachteten. Eine spezifische ITP-ase und ATP-ase soll es in menschlichen Erythrocyten geben [16]. JÄRNEFELT [13] glaubt, daß die Spaltung von ITP, ATP, GTP, UTP und CTP durch Rattenhirn-Mikrosomen von einem Enzym allein, einer Na^+ - K^+ -stimulierten ATP-ase, bewirkt wird.

Es gibt demnach, soweit untersucht, sowohl spezifische als auch unspezifische Nucleosidtriphosphatasen im Cytoplasma und der Zellmembran. Die spezifischen NTP-asen in Fliegenmuskel-Mitochondrien und Erythrocyten dürften nicht identisch sein mit den Zellkern-NTP-asen, von denen sie sich durch die optimalen Reaktionsbedingungen, die Substratspezifität und anderes mehr unterscheiden. Die in einer früheren Untersuchung [25] aufgeworfene Frage, ob die Zellkern-Nucleosidtriphosphatasen auch an anderer Stelle vorkommen, ist nach neueren Untersuchungen mit den Hemmstoffen Strophantin und Valinomycin für die Zellmembran und die Mitochondrien zu verneinen [32].

5. SPEZIFISCHE NUCLEOSIDTRIPHOSPHATASEN AUS BAKTERIEN

Spezifische Nucleosidtriphosphatasen für dGTP, dCTP und dUTP wurden in Extrakten aus *Escherichia coli* nachgewiesen (zusammenfassende Darstellung bei [29]). Für die Desoxycytidintriphosphatase aus Phagen-infizierter *Escherichia coli* ließ sich wahrscheinlich machen, daß sie für die Steuerung der Basenzusammensetzung neusynthetisierter Desoxyribonucleinsäure von Bedeutung ist [41].

Nach unseren Untersuchungen kann das Vorkommen spezifischer Nucleosidtriphosphatasen, die Desoxyribonucleosidtriphosphate spalten, auch für die Rattenleber angenommen werden. Es folgt daraus die Überlegung, ob diese Enzyme, wie bei *Escherichia coli*, für die Basenzusammensetzung der Zellkern-DNS von Bedeutung sein können. Bisher läßt sich darauf keine experimentell gesicherte Antwort geben. Im folgenden Abschnitt wird versucht werden, einen Diskussionsbeitrag zu der Frage zu liefern, ob die Nucleosidtriphosphatasen im Rahmen der DNS-Synthese und der RNS- bzw. Proteinsynthese eine regulierende Aufgabe erfüllen.

B) Aktivitätsänderungen

Neben Spezifitätsänderungen stellten wir Aktivitätsänderungen fest. Wie bei den Spezifitätsänderungen ist als Ursache dafür an die Zellkernherstellung, Effektoren, veränderte Enzymsyntheserate, ATP und Nucleosidtriphosphate spaltende Nebenreaktionen, das Auftreten neuer NTP-asen und die Kombination mehrerer dieser Faktoren, zu denken. Während durch Vergleich mit anderen Untersuchungen als Ursache für die Spezifitätsänderungen spezifische NTP-asen wahrscheinlich gemacht werden konnten, können für die Aktivitätsänderungen keine sicheren Angaben gemacht werden.

Wir beobachteten unter den Reaktionsbedingungen der NTP-ase A sowie NTP-ase B eine gesteigerte Substratspaltung nach Adrenalectomie und nach 3'-Me-DAB-Gabe, eine verringerte nach Thioacetamidgabe und nach Proteinmangelernährung. Nach Proteinmangelernährung mit Wiederauffütterung liegen die Spaltungsraten im Bereich der Kontrollwerte, desgleichen nach L-Thyroxingabe, aber mit größerer Streuung bei der NTP-ase A und bei der NTP-ase B mit „schwach gesicherter“ Tendenz zur Verringerung der Substratspaltung. Die Echtheit der Aktivitätssteigerung nach Thioacetamid ist zweifelhaft, da allein der oben zitierte angestiegene DNS-Gehalt der Zellkerne Ursache der Verschiebung sein kann. Das Gleiche gilt für den Anstieg in der 3'-Me-DAB-Versuchsgruppe, der bei einem fraglichen Abfall des DNS-Gehaltes [22] ebenfalls nicht Ausdruck einer tatsächlichen Aktivitätsänderung der NTP-asen sein muß.

In früheren Arbeiten [27, 31] ist zur Frage der Funktion der NTP-asen die Vermutung geäußert worden, daß sie durch

Angriff am Vorläufer-Pool der Nucleinsäure-Synthese (DNS- und RNS-Synthese) bestimmte Aufgaben im Rahmen der Zellkerngenetik und der vom Zellkern gesteuerten Proteinsynthese zu erfüllen hätten, möglicherweise im Sinne von Repressorphanomen. Wir wollen im folgenden prüfen, ob und in wie weit sich unsere Befunde mit dieser Hypothese in Einklang bringen lassen.

Wie erwähnt, zeigt sich 3-4 Tage nach Adrenalectomie noch keine Veränderung des DNS-Gehaltes von Rattenleberzellkernen, und erst nach Ablauf dieser Zeit setzt ein Anstieg ein [18]. Da die adrenalectomierten Tiere bei unseren Versuchen 3 Tage nach der Operation getötet wurden, ist die für alle Substrate stark gesteigerte Aktivität der NTP-asen bereits vor Zunahme des DNS-Gehaltes der Zellkerne ausgebildet. Spätere Untersuchungen müssen zeigen, ob diesem zeitlichen Zusammenhang ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen DNS-Vermehrung und NTP-asen-Aktivität entspricht.

Nach Proteinmangelernährung bleibt der DNS-Gehalt von Zellkernen konstant, während Zellkern-RNS und eine bestimmte Proteinfraction - beide wahrscheinlich im Nucleolus lokalisiert - anstiegen [7, 12]. Der gleichzeitige Abfall der NTP-asen-Aktivität würde der Vorstellung nicht widersprechen, daß durch Angriff am Vorläufer-Pool - im Sinne einer verringerten NTP-Spaltung - die RNS-Synthese und davon abhängige Proteinsynthese reguliert und zwar in diesem Falle gesteigert werden könnte.

Ähnliche Verhältnisse treffen wir nach L-Thyroxingabe an. Auch hier wurde von anderen Untersuchern eine gesteigerte RNS-Polymeraseaktivität und Vermehrung der Zellkern-RNS festgestellt [36], die sich wiederum der bei der NTP-ase B beobachteten geringeren Spaltungsrate einiger Nucleosidtriphosphate sinnvoll zuordnen ließen.

Wir möchten demnach meinen, daß sich unsere Ergebnisse mit obiger Hypothese der funktionellen Bedeutung der NTP-asen gut in Zusammenhang bringen lassen.

Bei einer Gegenüberstellung der NTP-asen-Aktivitätsänderungen in Zellkernen und der ATP-asen- und NTP-asen-Aktivität anderer Zelllokalisation könnten wir nur eine vergleichbare Untersuchung finden, bei der gleiches Gewebematerial verwendet und die gleichen Tierexperimente durchgeführt wurden. REID et al. [19] fanden nach Adrenalectomie einen Aktivitätsabfall der Mg^{2+} -aktivierten ATP-asen in der Mikrosomenfraction, der aber nicht vor dem dritten Tag nach der Operation einsetzte. Die Zellkern-ATP-asen zeigen demgegenüber ein deutlich anderes Verhalten, indem sie schon am dritten Tage nach der Operation ihre Nucleosidtriphosphatspaltung stark gesteigert haben.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach experimenteller Beeinflussung des Zellkernstoffwechsels wurde die Aktivität der Zellkernnucleosidtriphosphatasen A und B in Rattenleberzellkernen gemessen. Das untersuchte Material stammte von Ratten, die den folgenden Experimenten ausgesetzt waren:

Adrenalektomie, L-Thyroxininjektion, 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol-Fütterung (= Buttermilchgelb), Thioacetamid-Fütterung, Proteinmangelernährung und Wiederauffütterung nach Proteinmangel.

2. Nach Adrenalektomie wurde eine signifikante Aktivitätssteigerung der NTP-asen A und B festgestellt, nach Proteinmangelernährung ein signifikanter Aktivitätsabfall der NTP-asen A und B und nach L-Thyroxininjektion ein ebenfalls signifikanter Abfall der Aktivität der NTP-ase B in Bezug auf mehrere Substrate.
3. In mehreren Fällen wurde eine Änderung der Substratspezifität beobachtet. Die Spezifität für ATP, GTP und UTP änderte sich bei der NTP-ase A zweimal, für dCTP dreimal und für dGTP und TTP einmal. Bei der NTP-ase B war CTP zweimal von einer Spezifitätsänderung betroffen und GTP, ITP, dGTP, dATP und TTP je einmal. Diese Änderungen sind nicht statistisch gesichert, da sich aufgrund des Materials kein Test einsetzen läßt.
4. In der Diskussion wurde die Ansicht vertreten, daß die beobachteten Substratspezifitätsänderungen durch das Vorkommen von Nucleosidtriphosphatasen mit ausgeprägter Substratspezifität zu erklären seien. Durch Vergleich mit anderen Untersuchungen konnte eine ATP-ase, GTP-ase und UTP-ase wahrscheinlich gemacht werden, die unter den für die NTP-ase A optimalen Reaktionsbedingungen wirksam sind. Es wurde die Vermutung geäußert, daß es weitere spezifische Nucleosidtriphosphatasen gibt für dCTP, dGTP und TTP bei der NTP-ase A und bei der NTP-ase B für CTP, dGTP, dATP und TTP.
5. Die Aktivitätsänderungen der NTP-ase A und B /nach Proteinmangelernährung und der NTP-ase B nach L-Thyroxininjektion/ ließen sich mit einer von anderer Seite entwickelten Vorstellung über die Funktion der Zellkern-NTP-asen in Zusammenhang bringen.

L I T E R A T U R

- (1) ASHWORTH, C.T., F.J.LUIBEL, and S.C.STEWART: The fine structural localisation of ATP-ase in the small intestine, kidney and liver of the rat. In *Journal of Cell Biology* 17 (1963), S.1-18
- (2) BÄSSLER, K.H.: Glutaminsäuredehydrogenase. In Hoppe-Seyler/Thierfelders Handbuch, 10.Aufl. Bd 6/A (1964), S.638-653
- (3) CHIGA, M.: Adenosine triphosphatase activity of mitochondria. In Hoppe-Seyler/Thierfelders Handbuch, 10.Aufl. Bd 6/C (1965), S.424-438
- (4) DIXON, M., and E.C.WEBB: *Enzymes*, 2.Aufl., S. 199-204, London 1964
- (5) FISCHER, F., G.SIEBERT, und E.ADLOFF: Charakterisierung von zwei Adenosintriphosphatasen in Schweinenieren-Zellkernen. In *Biochem.Z.* 332 (1959), S.131-150
- (6) GREVILLE, G.D., and E.REICH: Effects of 2:4-dinitrophenol and other agents on the nucleoside triphosphatase activities of L-myosin. In *Biochim.biophys. Acta* 20 (1956), S.440-442
- (7) HARRISON, H.T.: Effects of starvation on the composition of the liver cell. In *The Biochem.J.* 55 (1953), S.204-211
- (8) HASSELBACH, W., und H.H.WEBER: Contractile ATP-asen. In Hoppe-Seyler/Thierfelders Handbuch, 10. Aufl. Bd 6/C (1965), S.413-423
- (9) HAWTREY, A.O., and L.D.NOURSE: The effect of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene on protein synthesis and DNA-dependent RNA-polymerase activity in rat-liver nuclei. In *Biochim.biophys.Acta* 80 (1964), S.530-532
- (10) HINSBERG, K., und K.LANG: *Medizinische Chemie*, 3.Aufl. S.718, Berlin 1956
- (11) HOHORST, H.F., F.H.KREUTZ, und T.BÜCHER: Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der Leber. In *Biochem.Z.* 332 (1953), S.18-46

- (12) HRYNIEWICZKI, L.: Nuclear protein in the liver in protein-calorie deficiency. In *Biochem.J.* 95 (1965), S.238-244
- (13) JARNEFELT, J.: Properties and possible mechanism of the Na⁺- and K⁺-stimulated microsomal adenositriphosphatase. In *Biochim.biophys.Acta* 59 (1962), S.643-654
- (14) LANGENDORF, H., H.SIEBERT, I.LORENZ, R.HANNOVER, und R.BEYER: Kaliumverteilung in Zellkernen und Cytoplasma der Rattenleber. In *Biochem.Z.* 335 (1961), S.273-284
- (15) LEWIS, M., and S.WEISSMANN: Properties of a soluble nucleoside triphosphatase activity in mammalian liver. In *Arch.Biochem.* 109 (1965), S.490-498
- (16) LIAKOPOULOU, A., and S.G.A.ALIVISATOS: Distribution of nucleoside triphosphatases in human erythrocytes. In *Biochim.biophys.Acta* 89 (1964), S.158-161
- (17) PULLMAN, M.E., H.S.BENEFSKY, A.DATTA, and E.RACKER: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. In *J.biol.Chem.* 235 (1960), S.3322-3329
- (18) REID, E., M.A.O'NEAL, B.M.STEVENS, and V.C.E.BURNOP: Hormonal influences on the incorporation of injected precursors into the protein and ribonucleic acid of liver cytoplasm. In *Biochem.J.* 64 (1954), S.33-38
- (19) -, -, and J.LEWIN: Hormones and liver cytoplasm. In *Biochem.J.* 64 (1954), S.730-740
- (20) -, and B.M.STEVENS: Hormones and liver cytoplasm. In *Biochem.J.* 67 (1957), S.262-274
- (21) -, and -: Hormones and liver cytoplasm. In *Biochem.J.* 68 (1958), S.367-374
- (22) REES, K.R., and G.F.ROWLAND: The metabolism of isolated rat-liver-nuclei during chemical carcinogenesis. In *Biochem.J.* 80 (1961), S.428-433
- (23) SACKTOR, B., and D.G.COCHRAN: Dephosphorylation of nucleotides by insect flight muscle. In *J.biol.Chem.* 226 (1957), S.241-254
- (24) SCHNEIDER, W.C.: Determination of nucleic acids in tissue by pentose analysis. In *Methods in Enzymology*, Bd 3, S.680-684, New York 1957
- (25) SIEBERT, G., und E.ADLOFF: Spaltung von Desoxyribonucleosidtriphosphaten durch Zellkern-Adenosintriphosphatasen. In *Biochem.Z.* 333 (1960), S.202-204
- (26) -: Enzyme und Substrate der Glykolyse in isolierten Zellkernen. In *Biochem.Z.* 334 (1961), S.369-387

- (27) -: Enzymes of cancer nuclei. In *Exp.Cell Res.*, Suppl. 9 (1963), S.389-417
- (28) -: Gewinnung von Zellkernen und anderen Zellfraktionen in nichtwäßrigen Medien. In *Biochemisches Taschenbuch* (H.M.Rauen,Hrsg.) 2. Aufl., Bd 2, S.451-546, Heidelberg 1964
- (29) -: Andere Nucleosidtriphosphatasen. In *Hoppe-Seyler/Thierfelders Handbuch* 10.Aufl. Bd 6/C (1965), S.439-460
- (30) -, G.B.HUMPHREY, H.THEMANN, und W.KERSTEN: Neue Kriterien zur Beurteilung isolierter Zellkerne. In *Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.* 340 (1965), S.51-72
- (31) -, and G.B.HUMPHREY: Enzymology of the nucleus. In *Adv.Enzymol.* 27 (1965), S.239-288
- (32) -, H.LANGENDORF, R.HANNOVER, D.NITZ-LITZOW, B.C.PRESSMAN, und C.MOORE: Untersuchungen zur Rolle des Natrium-Stoffwechsels im Zellkern der Rattenleber. In *Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.* 343 (1965), S.101-115
- (33) -, J.VILLALOBOS jr., T.S.RO, W.J.STEELE, G.LINDENMAYER, H.ADAMS, and H.BUSCH: Enzymatic studies on isolated nucleoli of rat liver. In *J.biol.Chem.* 241 (1966), S.71-78
- (34) -, und I.BAUER: unveröffentlicht
- (35) STEELE, W.J., N.OKAMURA, and H.BUSCH: Effects of thioacetamide on the composition and biosynthesis of nucleolar and nuclear ribonucleic acid in rat liver. In *J.biol.Chem.* 240 (1965), S.1742-1749
- (36) TATA, J.R., and C.C.WIDNELL: Nucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones. In *Biochem.J.* 92 (1964), S.26 P
- (37) VILLALOBOS jr., J.G., W.J.STEELE, and H.BUSCH: Effects of thioacetamide on labeling of ribonucleic acid of isolated nucleoli in vitro. In *Biochim.biophys.Acta* 91 (1964), S.233-238
- (38) WAERDEN, B.L. VAN DER -: Mathematische Statistik (= Die Grundlehren der Mathematischen Wissenschaften Bd 87) S.262-264, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957
- (39) -: - - - S.345
- (40) WEIL-MALHERBE, H.: Organische Phosphorsäureverbindungen. In *Hoppe-Seyler/Thierfelders Handbuch* 10.Aufl. Bd 3/1 (1955), S.466
- (41) ZIMMERMANN, S.B., and A.KORNBERG: Desoxycytidine di- and triphosphate cleavage by an enzyme formed in bacteriophage-infected *Escherichia coli*. In *J.biol.Chem.* 236 (1961), S.1480-1486

Es ist mir eine ebenso angenehme wie dringende Pflicht,

Herrn

Professor Dr. med. Günther S i e b e r t

an dieser Stelle meinen ergebenen Dank sagen zu dürfen

für die freundliche Überlassung des Themas
und die jederzeit bereitwillige Unterstützung
bei der Durchführung der Arbeit.

Frau I. S c h a d e danke ich für ihre liebenswürdige Hilfe
bei der Einarbeitung in die Untersuchungsmethode,

Herrn Professor Dr.phil. Dr.med. G. K o l l e r
und

Herrn Dr.med. K. Ü b e r l a

für Rat und Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung
und graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Die Gewinnung und die Analyse der Zellkerne
auf ihren RNS- und DNS-Gehalt
wurden von Herrn R. B e y e r ausgeführt.

LEBENS LAUF

Am 4. Januar 1942 wurde ich als dritter Sohn der evangelischen Eheleute Kurt Zeidler, Studienrat für Mathematik, Physik und Chemie, und Auguste Zeidler, geb. Goetze, staatlich geprüfte Diätassistentin, in Berlin - Charlottenburg geboren. Im November 1943 wurden meine Eltern nach Sorau in der Niederlausitz evakuiert. Seit März 1944 ist mein Vater vermißt und seit 1949 für tot erklärt. Seit Juni 1945 wohne ich in Bad Kreuznach. Von Herbst 1947 an besuchte ich die Volksschule, trat Ostern 1951 in die altsprachliche Abteilung des Staatlichen Gymnasiums von Bad Kreuznach ein und legte im Februar 1961 die Reifeprüfung ab.

Seit dem Sommersemester 1961 bin ich in der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz immatrikuliert. Am 30. April 1962 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab, am 1. August 1963 die ärztliche Vorprüfung.

Am 9. Mai 1964 starb meine Mutter.

Seit April 1965 bin ich Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes. --

Satz: F.LAMP, Berlin 12, Leibnizstr.86
auf Olympia SGE 30, Schriftarten 83 u.84

Druck: Engelbert Pfriem, Wuppertal-Elberfeld,
Baustraße 47 -49

